

JOÃO CARLOS MINOZZO

TENÍASE/CISTICERCOSE
TESTE DE ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA
CISTICERCOSE BOVINA

Tese apresentada para a obtenção do título de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná
Área de concentração: Patologia Veterinária.

Orientadores:

Prof.^a Dr.^a Vanete Thomaz Soccol

Prof. Dr. Carlos Chávez-Olórtegui

CURITIBA

1997

JOÃO CARLOS MINOZZO

**TENÍASE/CISTICERCOSE
TESTE DE ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY) PARA
IMUNODIAGNÓSTICO DA CISTICERCOSE BOVINA**

Tese apresentada para a obtenção do título
de Mestre no curso de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias, Setor de Ciências
Agrárias, Universidade Federal do Paraná
Área de concentração :
Patologia Veterinária

Orientadores :
Prof.^a Dr.^a Vanete Thomaz Soccol
Prof. Dr. Carlos Chávez-Olórtegui

Curitiba
1997

A COMISSÃO EXAMINADORA, ABAIXO ASSINADA,

APROVA A TESE

**TENÍASE/CISTICERCOSE
TESTE DE ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA CISTICERCOSE
BOVINA**

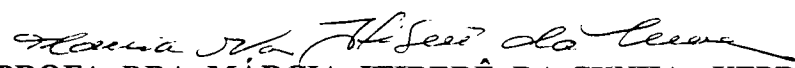
ELABORADA PELO

Médico Veterinário

JOÃO CARLOS MINOZZO

COMISSÃO EXAMINADORA:


**PROFa. DRa. VANETE THOMAZ SOCCOL - UFPR
PRESIDENTE/ORIENTADORA**


**PROFA. DRa. MÁRCIA ITIBERÊ DA CUNHA - UFPR
MEMBRO EFETIVO**


**PROF. DR. ENNIO LUZ - UFPR
MEMBRO EFETIVO**

**CURITIBA
1997**

DEDICO ESTE TRABALHO COM TODO CARINHO

À memória de meu pai, Xavier Onório Minozzo;

À minha mãe, Helena Costa Minozzo;

que bravamente lutaram para que seus filhos
galgassem os degraus do conhecimento.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente, por tornar possível este sonho, por ter-me permitido conhecer e conviver com pessoas tão especiais.

À minha esposa, Albina Lurdes, que compartilhou de meus ideais, incentivando-me em todos os momentos a prosseguir nesta jornada.

Aos meus filhos Carla Eloisa e Guilherme Augusto, meus tesouros, pela paciência e compreensão durante este período em que muitas vezes estive ausente.

À professora Dr^a. Vanete Thomaz Soccol, pela orientação, dedicação, estímulos durante a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Carlos Chávez-Olórtegui, pelo fornecimento de insumos, orientação e sugestões no desenvolvimento desta tese.

As professoras Edilene A. de Castro e Rosângela Clara Paulino pela colaboração na correção deste manuscrito.

A Farmacêutica Sandra Ruiz Sella, diretora do CPPI, pelo apoio no desenvolvimento da pesquisa.

Aos Médicos Veterinários Rubens Luiz Ferreira Gusso e Cristiane Maria Lopes pela colaboração no desenvolvimento da infecção experimental.

Ao Médico Veterinário Luiz A. Gasparetto pela colaboração no abate e inspeção.

Ao Centro e Produção e Pesquisas de Imunobiológicos pelo auxílio no desenvolvimento dos ensaios biológicos.

Ao Instituto Agrônômico do Paraná e a Cooperativa de Leite de Curitiba pelo fornecimento de Animais.

Aos Laboratórios Frichaman-Aisengard e Municipal de Curitiba pelo auxílio na obtenção das proglotes.

Ao Departamento de Microscopia eletrônica da UFPR pelo auxílio das fotomicrografias dos cisticercos.

Ao Departamento de Patologia Básica da UFPR pela oportunidade de desenvolver estudos nos laboratórios de Parasitologia Veterinária e Imunologia.

Ao departamento de Bioquímica da UFPR pelo auxílio na Sonicação e Centrifugação.

A Enfermeira Maria Glicia Rocha da Costa e Silva de Noronha pelo auxílio prestado na digitação da tese.

Ao Médico Veterinário Felipe Pohl de Sousa pela colaboração na colheita de sangue.

Ao Médico Veterinário Paulo Sérgio Arruda Pinto pela gentileza do fornecimento de antígeno.

A Médica Veterinária Wany S. Maria pelo auxílio no teste de ELISA.

Às Farmacêuticas Wilma R. Guerra e Neide Fogiato B. Binder., CPPI, pela participação na produção de antígenos e determinação de proteínas.

Ao Médico Veterinário Oscar Lago Pessoa pelo auxílio na inspeção das carcaças.

Às Bibliotecárias Telma Stresser e Neiva M. Minozzo pelos esclarecimentos da forma de apresentação das referências bibliográficas.

Aos Colegas do CPPI pelo auxílio na infecção experimental.

A CAPES pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desta tese.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	I
AGRADECIMENTOS.....	II
SUMÁRIO.....	V
RESUMO	IX
INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO I - GENERALIDADES: <i>TAENIA/CISTICERCO</i>	7
1 OS PARASITAS NO HOSPEDEIRO DEFINITIVO.....	8
1.1 POSIÇÃO TAXONÔMICA.....	8
1.2 MORFOLOGIA DO PARASITA.....	8
1.2.1 <i>Taenia solium</i>	8
1.2.2 <i>Taenia saginata</i>	9
1.3 OVOS.....	10
2 A LARVA NO HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO.....	11
3 ELEMENTOS DO CICLO BIOLÓGICO.....	14
3.1 <i>Cysticercus bovis</i>	15
3.2 <i>Cysticercus cellulosae</i>	16
4 AÇÕES SOBRE O HOSPEDEIRO.....	17
4.1 AÇÃO DA TÊNIA ADULTA.....	17
4.1.1 Infecções por <i>Taenia saginata</i>	18
4.1.2 Infecções por <i>Taenia solium</i>	19
4.2 AÇÃO DO CISTICERCO.....	20

4.2.1	Cisticercose humana.....	20
4.2.1.1	Neurocisticercose.....	21
4.2.1.2	Cisticercose ocular.....	23
4.2.1.3	Cisticercose muscular e subcutânea.....	23
4.2.2	Cisticercose animal.....	23
5	EPIDEMIOLOGIA.....	24
II	CAPÍTULO II - INFECÇÃO EXPERIMENTAL/ TESTE DE ELISA PARA	
	IMUNODIAGNÓSTICO DA CISTICERCOSE BOVINA.....	28
1	INTRODUÇÃO.....	29
2	METODOLOGIA.....	31
2.1	MATERIAIS.....	31
2.2	MÉTODOS.....	31
2.2.1	INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE BEZERROS COM OVOS DE	
	<i>TAENIA SAGINATA</i>	31
2.2.1.1	Obtenção dos ovos	31
2.2.1.2	Animais de experimentação.....	32
2.2.1.3	Infecção.....	32
2.2.1.4	Amostras de soros.....	33
2.2.1.5	Abate de animais.....	33
2.2.1.6	Necropsia e inspeção de musculatura e órgãos.....	34
2.2.1.7	Identificação e classificação dos cisticercos recuperados.....	34
2.2.2	TESTE DE ELISA PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA CISTICERCOSE	
	BOVINA.....	36
2.2.2.1	Produção de antígenos.....	36

2.2.2.1.1 Antígeno extrato salino parcial de <i>Cysticercus cellulosae</i>	37
2.2.2.1.2 antígeno extrato salino total de <i>Cysticercus bovis</i>	38
2.2.2.1.3 Antígeno total de <i>Cysticercus longicollis</i>	39
2.2.2.2 Produção de conjugado.....	39
2.2.2.3 Condições gerais do teste de ELISA.....	40
2.2.2.3.1 Soluções utilizadas no teste de ELISA.....	41
2.2.2.3.2 Sensibilização da placa de ELISA.....	41
2.2.2.3.3 Primeira lavagem	41
2.2.2.3.4 Bloqueio da placa.....	42
2.2.2.3.5 Segunda lavagem.....	42
2.2.2.3.6 Diluição dos soros.....	42
2.2.2.3.7 Terceira lavagem.....	43
2.2.2.3.8 Diluição do conjugado.....	43
2.2.2.3.9 Quarta lavagem.....	44
2.2.2.3.10 Substrato.....	44
2.2.2.3.11 Parada da reação.....	44
2.2.2.3.12 Leitura.....	45
2.2.2.4 CUT-OFF.....	45
3 RESULTADOS	49
3.1 INFECÇÃO EXPERIMENTAL.....	49
3.2 TESTE DE ELISA.....	57
3.2.1 Padronização do antígeno.....	57
3.2.1.1 Antígeno extrato salino parcial de <i>Cysticercus cellulosae</i>	57
3.2.1.2 Antígeno extrato salino total de <i>Cysticercus bovis</i>	59

3.2.1.3 Antígeno total de <i>Cysticercus longicollis</i>	59
3.2.2 Diluição dos soros.....	61
3.2.3 Diluição do conjugado.....	61
3.2.4 CUT-OFF.....	61
3.2.4.1 Amostras de soros.....	62
3.2.5 Teste de ELISA dos bovinos experimentalmente infectados.....	66
3.2.5.1 Teste de ELISA com antígeno extrato salino parcial de <i>Cysticercus</i> <i>cellulosae</i>	66
3.2.5.2 Teste de ELISA com antígeno extrato salino total de <i>Cysticercus</i> <i>bovis</i>	69
3.2.5.3 Teste de ELISA com antígeno total de <i>Cysticercus longicollis</i>	72
3.2.6 Aplicabilidade do teste ELISA para detecção de anticorpos anti- <i>Cysticercus bovis</i> em bovinos considerados negativos na inspeção macroscópica.....	76
4 DISCUSSÃO.....	77
5 CONCLUSÕES.....	86
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
7 ANEXOS.....	1
7.1 ANEXO 1.....	1
7.2 ANEXO 2.....	3
7.3 ANEXO 3.....	6
7.4 ANEXO 4.....	7

RESUMO

TÍTULO TENÍASE/CISTICERCOSE: TESTE DE ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY) PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA CISTICERCOSE BOVINA

AUTOR João Carlos Minozzo

A primeira etapa do trabalho consta de uma revisão de literatura da ciclozoonose teníase e cisticercose.

Foi avaliado o comportamento imunológico de bovinos experimentalmente infectados com ovos de *Taenia saginata* através da cinética de produção de anticorpos anti-*Cysticercus bovis*. Três bezerros de 6,5 meses e um com 19 meses de idade foram infectados, por via oral, com 2×10^4 ovos de *Taenia saginata*. Um quinto bezerro serviu como testemunha. Após 90 a 111 dias da infecção, os animais foram abatidos. Fez-se inspeção por fatiamento de órgãos e musculatura esquelética com intervalo entre os cortes de, no máximo, cinco milímetros. Dos quatro bezerros desafiados foram recuperados 702 cisticercos sendo 570 (81,20%) vivos e 132 (18,80%) degenerados. A taxa de recuperação foi de 0,01% a 1,43% com média de 0,88%. Os 702 cisticercos encontrados apresentaram a seguinte distribuição anatômica: músculos hióideos 02 (0,28%), rins 03 (0,43%), língua 07 (1,00%), fígado 12 (1,71%), pulmões 15 (2,14%), diafragma 18 (2,56%), músculos da mastigação 25 (3,56%), coração 49 (6,98%), musculatura dianteira 323 (46,00%) e musculatura traseira 248 (35,33%). Foi padronizado o teste de ELISA indireto para pesquisa de anticorpos anti-*Cysticercus bovis* em bovinos, utilizando como antígeno o extrato salino parcial de *Cysticercus cellulosae*. O cut-off foi obtido com soro de 99 bovinos jovens considerados não portadores de cisticercos, ficou estabelecido como 0,310. Nos bovinos, experimentalmente infectados, foram pesquisados o desenvolvimento e a quantificação de anticorpos anti-*Cysticercus bovis* através da prova de ELISA indireta em 16 amostras de soros de cada animal. A primeira amostra foi colhida 97 dias antes da infecção dos animais, a segunda no dia da infecção experimental e as restantes, semanalmente, até o abate. Os anticorpos foram detectados a partir de 12 dias após a infecção, com pico inicial aos 27 dias. O ápice de reação, em todos os animais, ocorreu entre 41 e 55 dias depois da infecção. Em seguida, observou-se um lento declínio com um segundo pico de anticorpos, de menor intensidade, a partir de 75 dias. Através da prova ELISA foi comparada a reatividade dos antígenos extrato salino parcial de *Cysticercus cellulosae*, extrato salino total de *Cysticercus bovis* e antígeno total de *Cysticercus longicollis* com soros de bovinos portadores de cisticercos da *Taenia saginata*. Pesquisou-se também anticorpos anti-*Cysticercus bovis*, em soros de bovinos considerados como não portadores de cisticercos, pelo serviço de inspeção. De 20 amostras de soros analisadas, 02 (10%) apresentaram valores de absorbância acima do "cut-off". Estes animais seriam possíveis portadores de cisticercos.

INTRODUÇÃO

A cisticercose é uma zoonose na qual o agente etiológico é um cestoda da família *Taeniidae*, gênero *Taenia*. Estes parasitas evoluem em dois hospedeiros, sendo um definitivo (homem) e outro intermediário (geralmente animais domésticos).

Duas tênias parasitam o homem: *Taenia solium* e *Taenia saginata*. Pesquisas recentes dão como nova espécie, uma tênia geograficamente distribuída pelo continente Asiático (FAN et al., 1990). Esta última é semelhante a *Taenia saginata* clássica, porém, hospedeiros, localização, características morfológicas e fisiológicas dos cisticercos diferem das duas tênias reconhecidas pela literatura em geral.

Segundo ABDUSSALAN, (1974), deveriam existir no mundo em 1947 trinta e nove milhões de pessoas portadoras de *Taenia saginata* e 2,5 milhões de portadores de *Taenia solium*, o que dá uma proporção de 15,6:1. Desde então, a população cresceu acentuadamente, o mesmo ocorrendo com a população bovina e suína. As investigações de cisticercose animal e teníase humana, após este período, revelam a existência de focos com altas taxas de incidência, em zonas anteriormente livres ou que apresentavam baixa incidência. Além disso, a partir da metade do século, ocorreu uma drástica mudança no sistema de criação animal, buscando técnicas que permitiram um aumento significativo da produtividade.

A Organização Mundial da Saúde classifica a prevalência da *Taenia saginata* em três grupos: altamente endêmicos, países ou regiões com prevalência na população humana, acima de 10%; moderada prevalência, com taxa de infecção

entre 0,1 e 10%; baixa prevalência, com taxa de infecção inferior a 0,1% ou mesmo livres da endemia. Quanto a *Taenia solium*, é muito difícil avaliar a prevalência, devido aos métodos coproparasitológicos empregados serem geralmente inadequados e não permitirem a diferenciação entre ovos de *Taenia solium* e *Taenia saginata*. A presença de *Taenia solium* é importante em países cuja população consome carne suína e está restrita a regiões de baixo desenvolvimento social e econômico. Segundo a Organização Mundial da Saúde, a América do Sul está incluída entre os países de moderada prevalência para *Taenia saginata*, e considerada endêmica para *Taenia solium*. A prevalência varia de acordo com o nível regional de sanidade, tipo de criação de suínos e hábitos alimentares da população.

No Brasil não existem dados conclusivos quanto a prevalência da teníase e cisticercose. Na maioria dos Estados faltam dados confiáveis, mas sabe-se que a condenação de carcaças suínas, inspecionadas pelo Serviço de Inspeção Federal (DIPOA/SDA/MAARA), em 1986 e 1987 foram de 0,56% e 0,39%, respectivamente.

No Estado do Paraná, a incidência da teníase e cisticercose humana e da cisticercose animal é elevada, especialmente em algumas regiões. Todavia, faltam dados estatísticos conclusivos. Tentativas têm sido feitas para melhorar o diagnóstico da neurocisticercose. Para isso, foram implantados, a partir do início dos anos 90, em vários municípios, serviços de tomografia computadorizada. Os resultados obtidos nestes serviços, confirmam tal incidência. O município de Guarapuava, no período de 1992 a 1994 apresentou 21,6% de positividade para neurocisticercose; União da Vitória, em 1992, 19,8%; Londrina (Hospital Universitário), 1991 a 1993, 11,17%; Curitiba (Divisão de Vigilância Epidemiológica),

1992 e 1993, 9,94% e 8,84%, respectivamente. Estes dados assim elevados são, provavelmente, casos acumulados. Após cinco anos da implementação destes serviços é provável que ocorra uma estabilização. Estudo comparativo de pacientes com patologias diversas de origem neurológica, submetidos a tomografia computadorizada de crânio, no Hospital Nossa Senhora das Graças de Curitiba, revelou as seguintes porcentagens de portadores de neurocisticercose: 1978, de 3.400 exames, 4,00%; 1980, de 9.000 exames, 5,30%; 1992, de 85.000 exames, 9,10%; 1993, de 92.000, 9,20% (I Encontro do Cone sul e Seminário Latino Americano sobre Teníase e Cisticercose, Curitiba - Paraná, mar., 1994).

O índice de portadores de teníase no Paraná apresenta-se igualmente elevado. Em levantamento coproparasitológico, realizado em rotina, nos laboratórios da rede pública do Estado (LACEN), entre os anos 1990 - 1993, num total de 539.741 exames, 2.935 foram positivos para teníase, perfazendo índice de 0,54%. Algumas regionais de saúde (RS) chegam a apresentar índices mais elevados, como, por exemplo, a 13ª RS (Cianorte) e 23ª RS (Curitiba - região metropolitana norte) com, respectivamente, 3,07% e 1,60%. Em pesquisas direcionadas para teníase, como aquelas realizadas nos municípios de Barracão, Salgado Filho, Rio Branco do Sul (comunidade do Tigre) e Tijucas do Sul (comunidade do Postinho) revelaram índices de positividade de 1,02%, 1,43%, 4,60%, 4,30%, respectivamente. (I Encontro do Cone Sul e Seminário Latino Americano Sobre Teníase e Cisticercose, Curitiba - Paraná, mar., 1994).

Quanto a cisticercose animal, dados do Serviço de Inspeção Federal DIPOA/SDA/MAARA demonstraram que no período de 1989 a 1991, de 2.781.634 bovinos abatidos, 85.196 foram positivos para cisticercose, perfazendo 3,06% do

total. Neste período, foram abatidos 4.532.814 suínos, destes 1.323 foram positivos para cisticercose, correspondendo 0,03% do total. Todavia, estes índices refletem o abate de suínos tipo carne, criados em sistema de confinamento. Existe, porém, uma parcela importante de suínos criados extensivamente, muito mais sujeitos ao contato com fezes humanas e, portanto, com possibilidade de contraírem cisticercose. Estes animais por terem excesso de tecido adiposo, têm seu valor de comercialização diminuído e até são rejeitados pela indústria da carne. Por ser a carne suína uma fonte alimentar importante nas comunidades rurais, estes animais são abatidos no local de criação, ou comunidade próxima. É freqüente as carnes destes animais serem aproveitadas como embutidos, consumidos na propriedade ou por moradores da redondeza. Existe, ainda, o agravante destes embutidos serem ingeridos sem prévio cozimento. Esta situação amplia as possibilidades da disseminação da teníase e como consequência da cisticercose animal e humana.

Quanto aos métodos de diagnóstico, no Estado do Paraná, poucas técnicas estão atualmente disponíveis para teníase, neurocisticercose e cisticercose animal. Para diagnóstico da teníase humana dispõe-se apenas de exame coproparasitológico, enquanto que a cisticercose animal é identificada, após o abate, pela inspeção visual. Para a neurocisticercose humana, dispõe-se, a partir da suspeita clínica, de tomografia computadorizada e ressonância magnética. Os dados obtidos nesta última etapa diagnóstica mostram um elevado índice de indivíduos portadores de neurocisticercose. Muitos destes são diagnosticados em fase bastante avançada com seqüelas graves e irreversíveis. Um aperfeiçoamento e uma constante busca na melhoria das técnicas diagnósticas para teníase humana, cisticercose animal e humana são necessários. A tomografia computadorizada e a

ressonância magnética não podem ser levadas em consideração, em uma pesquisa estatística de massa, devido ao custo. Neste sentido, tem-se buscado técnicas práticas e viáveis, para um levantamento epidemiológico. Os métodos de diagnóstico imunológico têm sido utilizados, tentando responder a estas questões (VAZ et al., 1990; VIANNA et al., 1992; LONARDONI et al., 1996).

Rotineiramente o diagnóstico da cisticercose bovina, causada pela larva da *Taenia saginata*, é baseado na inspeção visual, após cortes específicos dos animais, nos matadouros. A sensibilidade do método é baixa, especialmente em infecções leves (MURRELL et al., 1986; KYVSGAARD et al., 1989). O desenvolvimento de um método diagnóstico confiável, *in vivo*, poderia servir como alternativa na rotina de inspeção nos matadouros e em investigações epidemiológicas.

Vários testes imunológicos têm sido propostos para detectar bovinos portadores de cisticercose (GEMMELL et al., 1983). Destes métodos, o Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) é considerado uma das técnicas mais adequadas para diagnóstico laboratorial de rotina, por sua alta sensibilidade e especificidade, além de permitir o processamento de várias amostras simultaneamente. Como antígeno diagnóstico para a prova de ELISA várias preparações homólogas e heterólogas têm sido analisadas. Já foram utilizados extratos de homogeneizado total de *Taenia saginata* adulta (CRAIG e RICKARD, 1980), antígenos de secreção-excreção de cultivo *in vitro* da *Taenia saginata* (HARRISON e SEWELL, 1981), extrato total da larva da *Taenia crassiceps* (GEERTS et al., 1981), fração do fluído cístico da larva da *Taenia hidatigena* (ThFAS) solúvel em sulfato de amônio 70% (KAMANGA-SOLLO et al., 1987; SMITH et al., 1990) e antígeno extraído por detergente da superfície do metacestoda da *Taenia saginata*

(HARRISON et al., 1989). Na maioria desses estudos tem sido empregado prova de ELISA indireta, para detecção de IgG.

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o comportamento imunológico de bovinos, experimentalmente infectados com ovos de *Taenia saginata*, levando em consideração o número, a localização e o estágio biológico dos cisticercos recuperados e sua correlação com a detecção e quantificação de anticorpos específicos.

Para atingir o objetivo proposto, numa primeira etapa, foi realizado infecção experimental de bovinos com ovos de *Taenia saginata*.

Numa segunda etapa foram preparados antígenos homólogo (*Cysticercus bovis*) e heterólogo (*Cysticercus cellulosae*).

Na terceira etapa avaliou-se, comparativamente a reatividade de antígenos homólogo (*Cysticercus bovis*) e heterólogo (*Cysticercus cellulosae*, *Cysticercus longicollis*) com o soro de bovinos experimentalmente infectados com ovos de *Taenia saginata*.

Na quarta etapa pesquisou-se anticorpos anti-cisticerco, em bovinos considerados livres de cisticercose pela inspeção normal, visando estudar a aplicabilidade da prova de ELISA.

Enfim, obteve-se a padronização da prova de ELISA indireta para o sorodiagnóstico da cisticercose bovina.

CAPÍTULO I

GENERALIDADES:

TAENIA/CISTICERCO

Os protagonistas, geralmente indispensáveis ao desenvolvimento completo, do ciclo das tênias são em número de dois: o parasita no hospedeiro definitivo (HD) e a larva no hospedeiro intermediário (HI).

1. - OS PARASITAS NO HOSPEDEIRO DEFINITIVO

1.1. - POSIÇÃO TAXONÔMICA.

Segundo YAMAGUTTI as tênias humanas pertencem:

- - Filo *Platyhelminthes*;
- - Classe Cestoidea RUDOLPHI, 1808.;
- - Ordem Cyclophyllidea (VAN BENEDEN, 1950); BRAN, 1990.;
- - Superfamília Taenoidea ZWICKE, 1941.;
- - Família Taeniidae LUDOWIG, 1886.;
- - Gênero *Taenia* LINNAEUS, 1758.;
- - Espécies *Taenia solium* LINNAEUS, 1758.;

Taenia saginata (GOEZE, 1782); WEINLAND, 1858.

1.2. - MORFOLOGIA DO PARASITA

1.2.1. - TAENIA SOLIUM

A *Taenia solium* mede um metro (m) e meio a quatro metros de comprimento, chegando em casos extremos, a oito metros. O estróbilo possui 800 a 900 proglotes. O escólex é arredondado, com 600 a 1000 micrômetros (µm) de

diâmetro, possuindo quatro ventosas hemisféricas com diâmetro de aproximadamente 400 µm e um rostro curto, armado com dupla coroa de ganchos. O número de ganchos ou acúleos nesta coroa varia de 22 a 32 e seu tamanho entre 160 a 180 µm na primeira fila e 110 a 140 µm fila posterior. O colo é curto e delgado, medindo aproximadamente 1.000 µm de comprimento e 500 µm de largura. As proglotes são classificadas em jovens, maduras e grávidas. As primeiras são mais largas do que compridas e as seguintes são aproximadamente quadradas. As grávidas, que estão prontas para se desprenderem do estróbilo, possuem comprimento de 10 a 12 milímetros (mm) e largura de cinco a seis milímetros.

Na *Taenia solium*, 62 a 72 dias após a ingestão do cisticerco, as primeiras proglotes grávidas estão prontas para serem expulsas. Normalmente são eliminados em cadeias de três a seis anéis, passivamente com as fezes, por possuírem musculatura pouco desenvolvida.

1.2.2. - TAENIA SAGINATA

A *Taenia saginata* mede quatro a doze metros de comprimento, podendo atingir até 25 metros, com largura de 25 mm. Possui escólex periforme com um a sete mm de diâmetro, inerte. No lugar do rostro possui uma depressão ventosiforme circular. As ventosas são ligeiramente elípticas, medindo de 500 a 800 µm de diâmetro. O colo é mais comprido do que o escólex e a largura é de aproximadamente sua metade. No estróbilo encontra-se de 1.000 a 2.000 proglotes. Os anéis jovens são mais largos que compridos, os maduros possuem comprimento e largura aproximadamente iguais, já as proglotes grávidas que estão prontas para

serem eliminadas, possuem comprimento de 20 a 30 mm e largura de cinco a sete milímetros.

Na *Taenia saginata* os primeiros anéis grávidos estão prontos para serem eliminados em torno de 87 dias após a ingestão do cisticerco. Geralmente destacam-se individualmente e são expulsos com as fezes ou deslocam-se isoladamente pelo ânus, por possuírem musculatura bastante desenvolvida.

As ventosas de ambas as tênias, são depressões acetabulares, formadas pelo tegumento que reveste o corpo do parasita. Elas são dotadas de fibras musculares com várias disposições: radial, circular e meridiana. Estas fibras possibilitam que as ventosas alterem a sua formação e sejam dotadas de movimentos.

Diariamente nove a doze proglotes são formadas e número semelhante são desprendidas, por ruptura nos sulcos que marcam o limite entre os anéis. Ambas as tênias, às vezes, podem eliminar um longo segmento, incluindo proglotes maduras ou mesmo jovens. Neste caso, posteriormente, por um determinado período não haverá eliminação de proglotes.

Estes parasitas podem sobreviver por longos períodos, havendo referência de até 25 anos para *Taenia solium* e 30 anos para a *Taenia saginata* (REY, 1991).

1.3. - OVOS

Em geral, as proglotes liberam seus ovos no meio exterior por meio de contrações musculares ou pela decomposição de suas estruturas. No entanto, os ovos podem ser encontrados nas fezes. Estes aparecem nos dejetos quer seja pela

ruptura de hérnias de fundos de sacos uterinos, entre o anel liberado e o que ficou preso à cadeia ou oriundos da compressão das proglotes ao passarem pelo esfíncter anal. Neste caso, há expulsão de grande quantidade de ovos.

Uma proglote grávida de *Taenia saginata* pode conter 80.000 ovos, com uma produção média diária de 720.000 ovos. Destes 50% são maduros, 40% imaturos e 10% estéreis (SILVERMAN, 1954). O formato destes ovos pode ser redondo-ovalado, com diâmetro variando de 45-48 por 43-54 micrômetros (μm).

Na *Taenia solium* as proglotes grávidas podem conter 30.000 a 50.000 ovos. Estes possuem formato variável, predominando os arredondados com diâmetro médio de 40 a 42 μm .

Os ovos destas tênias, morfologicamente, são muito semelhantes, sendo difícil a sua distinção. As estruturas constituintes de fora para dentro são: cápsula, embrióforo, membrana oncosférica, embrião hexacanto ou oncosfera. A cápsula normalmente é perdida com as fezes, devido sua grande fragilidade. O embrióforo é formado por blocos prismáticos de queratina, os quais possuem espessura aproximada de 3 μm , dando aparência de estrias radiais. O embrião hexacanto, que abandona o ovo, é uma pequena esfera provida de três pares de acúleos, razão pela qual recebeu o nome de oncosfera (do grego onkos = gancho), e de embrião hexacanto (do grego hex = seis, e akantha = espinho).

2. - A LARVA NO HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO

Cisticerco é a forma larvária da *Taenia saginata* e *Taenia solium*, desenvolvido nos hospedeiros intermediários a partir da ingestão de ovos viáveis.

O cisticerco da *Taenia saginata* é denominado *Cysticercus bovis* (a nomenclatura binomial não tem valor taxonômico). Ele apresenta-se como uma vesícula translúcida, de aspecto perláceo, ovóide ou alongada devido às pressões dos tecidos que os envolvem. Esta vesícula, quando completamente desenvolvida, em torno de 10 semanas, possui dimensões de sete a dez milímetros de comprimento e quatro a seis milímetros de largura. Esta vesícula é constituída por: membrana adventícia, oriunda de reação inflamatória do hospedeiro, exsudato inflamatório, membrana parasitária repleta de líquido transparente, *receptaculum capitis* com o escólex invaginado da futura *Taenia*. O escólex contém quatro ventosas e uma depressão ventosiforme.

Cysticercus cellulosae é a denominação do cisticerco da *Taenia solium* (a nomenclatura binomial também não tem valor taxonômico). Depois de 100 a 200 dias da ingestão dos ovos o cisticerco está completamente formado, apresentando-se como uma vesícula elíptica, com 10 a 20 mm de diâmetro. Seus constituintes de fora para dentro são: membrana adventícia, exsudato inflamatório, membrana parasitária repleta de líquido transparente, *receptaculum capitis* com escólex invaginado da futura tênia. O escólex contém quatro ventosas e um rostro armado com duas fileiras de acúleos, cujo número varia de 22 a 32. Em comparação com o *Cysticercus bovis* a membrana do hospedeiro é mais transparente, permitindo externamente visualizar o *receptaculum capitis*.

FIGURA 1 - RESUMO DAS PRINCIPAIS DIFERENÇAS ENTRE TAENIA SAGINATA E TAENIA SOLIUM.

CARACTERÍSTICAS	TAENIA SAGINATA	TAENIA SOLIUM
FREQUÊNCIA	mais freqüente	menos freqüente
PARASITA ADULTO		
<i>Comprimento</i>	4 a 12 m, extremo 25 m	1,5 a 4 m, extremo 8 m
<i>Número de proglotes</i>	1.000 a 2.000	700 a 900
ESCÓLEX		
<i>Forma</i>	periforme e inerme	cubóide com rostro e dupla coroa de acúleos
<i>Diâmetro</i>	1 a 2 mm	0,6 a 1mm
COLO		
<i>Comprimento</i>	longo	curto
PROGLOTES MADURAS		
<i>Números de testículos</i>	300 a 400	150 a 300
<i>Números de lobos do ovário</i>	2	3
<i>Esfíncter vaginal</i>	presente	ausente
PROGLOTES GRÁVIDAS		
<i>Comprimento</i>	20 a 30 mm	10 a 12 mm
<i>Largura</i>	5 a 7 mm	5 a 6 mm
<i>Ramificações uterinas</i>	15 a 30 estreitas e dicotômicas	6 a 16 dendríticas ou arborescentes
OVOS		
<i>Forma</i>	redondos e ovalados	arredondados
<i>Diâmetro</i>	45 a 48 X 43 a 45 mm	40 a 42 mm
<i>Coloração de Ziehl - Neelsen</i>	retém o corante	não retém o corante
CISTICERCOSE HUMANA		
<i>Ocorrência</i>	não	sim
CISTICERCO		
<i>Forma</i>	alongado	elíptico
<i>Diâmetro</i>	7 a 10 mm X 4 a 6 mm	10 a 20 mm
<i>Membrana externa</i>	mais opaca	mais transparente

FONTE: LAPAGE,1981; BORCHERT,1981; PESSOA e MARTINS,1988, REY, 1991.

3. - ELEMENTOS DO CICLO BIOLÓGICO

A ciclozoonose Teníase/Cisticercose é uma parasitose intimamente ligada a hábitos higiênicos, culturais e às condições sócio-econômicas individual e coletiva das populações.

A *Taenia solium* e a *Taenia saginata* têm como hospedeiro definitivo habitual o homem. Este adquire *Taenia* ao ingerir carne crua ou insuficientemente cozida, de suínos e bovinos com cisticercos viáveis. As razões de ingerir carnes nestas condições, relaciona-se a fatores tais como: hábitos alimentares individuais e coletivos, crenças e ritos religiosos. Foi estabelecida uma relação entre vários tipos de alimentos a base de carnes mal cozidas, com as infecções por tênias. Algumas destas são: "shashlik" na Rússia e na Turquia (ABDULLAEV, 1918), "tikka" na Índia e Paquistão (ANATARAMAN, 1974), "basterma" no Egito (NAGATY, 1946), "larb" na Tailândia (CHULARERK et al., 1967), e as "bistecas" ou carnes insuficientemente assadas, com diversas denominações no centro e sul da África (CARMICHAEL, 1952). O consumo de línguas de suínos semi-cozidas que contêm cisticercos, em certas regiões da América Latina, é uma fonte especial de infecção (ABDUSSALAN, 1975).

Após a ingestão do cisticerco pelo homem, a *T. solium* atinge a fase adulta entre 62 e 72 dias e a *Taenia saginata*, aos 87 dias. A partir de então estes parasitas eliminam proglotes grávidas repletas de ovos. A eliminação de proglotes geralmente ocorre durante toda a sua existência (*Taenia solium* 25 anos, *Taenia saginata* 30 anos).

Os ovos destes parasitas quando ingeridos pelos hospedeiros intermediários, sofrem a ação dos sucos: gástrico, intestinal e biliar. O embrióforo é

digerido, liberando e ativando o embrião hexacanto ou oncosfera. A oncosfera liberada penetra ativamente na mucosa intestinal, alcança os vasos sanguíneos e linfáticos, vai ao fígado pelo sistema porta-hepático e deste, pela circulação geral, podendo localizar-se em vários órgãos. Normalmente tem predileção por tecido conjuntivo entre as fibras musculares. A oncosfera sofre um processo de vesiculação e perde seus seis acúleos. Da parede da vesícula formada crescerá internamente o escólex invaginado, já com as características da futura tênia.

3.1. - CYSTICERCUS BOVIS

O cisticerco da *Taenia saginata* possui predileção pela musculatura cardíaca e esquelética. Alguns, no entanto, desenvolvem-se na língua, laringe, esôfago, diafragma e cauda. Em infecções maciças localizam-se também nos pulmões, fígado, cérebro, gânglios linfáticos, pele, rins, tecido subcutâneo e tecido adiposo (BORCHERT, 1981).

Duas semanas após a ingestão dos ovos, os cisticercos já são visíveis a olho nu, como nódulos de diâmetro aproximado de dois milímetros. A aparência permanece idêntica até aproximadamente 28 dias após infecção. Esta nodulação precoce pode ser facilmente confundida com outros agentes parasitários. Com dez semanas os cisticercos atingem o completo desenvolvimento e são infectantes para o homem. Neste estágio aparecem como uma vesícula de 7 a 10 mm de comprimento por 4 a 6 mm de largura (REY, 1991).

3.2. - *CYSTICERCUS CELLULOSAE*

O cisticerco da *Taenia solium* desenvolve-se preferencialmente na musculatura esquelética e cardíaca. Entretanto, pode ser encontrado em qualquer parte do organismo.

Com uma semana após a infecção, o cisticerco em formação aparece como nódulo de 38 a 58 por 27 a 54 μ m de diâmetro. Com 20 a 30 dias mede de 1 a 4 por 0,8 a 3 mm de diâmetro, mostrando já o escólex e o começo da formação de uma cápsula de tecido conjuntivo. Entre 40 a 50 dias suas dimensões são de 3,5 a 8 por 3 a 6,5 mm de diâmetro, o escólex já está desenvolvido e é infectante para o homem. Com dez semanas atinge 6 a 8,5 por 3 a 6,5 mm de diâmetro. Com 100 a 120 dias atinge o tamanho máximo de 10 a 20 mm de diâmetro e formato elíptico (BORCHERT, 1981).

Os hospedeiros intermediários habituais da *Taenia saginata* são os bovídeos (*Bos taurus*, *Bos indicus*, *Bos bufellus*, *Bos gruniens*). No entanto, existem citações da existência de vários hospedeiros intermediários não habituais. A rena (*Rangifer tarandus*), foi reportada como hospedeiro intermediário, no norte da Sibéria, na Rússia (SAFRONOV, 1960). Nas Filipinas, uma situação epidemiológica anômala parece existir: casos humanos são atribuídos a *Taenia saginata*, entretanto a população local consome principalmente carne suína, sendo raro o consumo de carne bovina (ARAMBULO, et al., 1976). Uma situação semelhante é observada em uma área de Taiwan, onde não existem bovinos. Estudos têm insinuado que as cabras são os hospedeiros intermediários habituais da *Taenia saginata* (HUANG, 1967). Infecção experimental comprovou que o oryx (*Oryx gazella beisa*) pode ser hospedeiro intermediário da *Taenia saginata* (STEVENSON et al., 1982). O homem

não é normalmente citado como hospedeiro intermediário da *Taenia saginata*. Entretanto, cisticercos desarmados têm sido encontrados nos seres humanos (FONTAN, 1919; RIVAS, 1937; NINO, 1950; FAY, 1972; PAWLOWSKI e SCHULTZ, 1972).

A *Taenia solium* tem como hospedeiro intermediário normal o suíno doméstico e o javali (*Sus scrofa*). Outros hospedeiros intermediários citados na literatura são: ovelha, cabra, cão, gato, rato, cavalo, bovino, lebre, macaco (BORCHERT, 1981). Em várias espécies de macacos e outros animais têm sido descrito a presença de cisticercos providos de acúleos, porém falta a confirmação sistemática de que se trata da forma larvária da *Taenia solium* (GEMMEL et al., 1983). Uma forma multilobulada de larva é encontrada no cérebro humano, descrita como *Cysticercus racemosus*, entretanto esta pode ou não ser oriunda de ovos da *Taenia solium* (JUNG, 1981).

4. - AÇÃO SOBRE O HOSPEDEIRO

4.1. - AÇÃO DA TÊNIA ADULTA

A teníase é freqüentemente assintomática, normalmente os indivíduos só percebem o parasitismo quando visualizam as proglotes. Muitos pacientes, depois de saberem que são portadores de tênia começam a manifestar alguma sintomatologia, mostrando haver um componente psicológico importante no quadro clínico apresentado (PROCTOR, 1972; ADONAJO et al., 1975, 1976; PAWLOWSKI, 1980, 1981).

Apesar da sólida fixação das tênias à mucosa do intestino delgado, os estudos anatomopatológicos não revelaram produção de lesões a esse nível.

4.1.1. - INFECÇÕES POR *TAENIA SAGINATA*

Teníase causada pela *Taenia saginata* é uma infecção intestinal não fatal para o homem. Em uma revisão clínica (PAWLOWSKI e SCHULTZ, 1972) a frequência de diferentes sintomas presentes em três de quatro pacientes com *Taenia saginata* foram: dores abdominais 35,60%; náuseas 34,40%; debilidade 24,80%; perda de peso 21,00%; aumento do apetite 17,00%; cefaléia 15,50%; constipação 9,40%, vertigem 8,20%; diarreia 5,90%; prurido anal 4,50%; nervosismo 3,40%. Algumas vezes, o prurido anal é que leva à descoberta das proglotes, quando estas saem ativamente. Ocasionalmente, proglotes podem adentrar nos ductos biliares e no apêndice, causando obstruções, cólicas ou apendicites (BERRY e BURROWS, 1955; PROCTOR, 1972, MAKARUK et al., 1979).

Raramente as proglotes podem ser aspiradas durante o vômito causando obstruções do trato respiratório (SHAHIN, 1932). O volume de um exemplar médio de *Taenia saginata* equivale a aproximadamente a um litro, ocupando espaço considerável. Como todo cestódeo, as tênias retiram certos metabólitos do hospedeiro e como produtos catabólitos produzem substâncias tóxicas, responsáveis por alguns dos sintomas (LAPAGE, 1981). A presença da *Taenia saginata* causa, com maior frequência, alterações da motilidade e da secreção digestiva. Em torno de 70% dos casos há uma redução da secreção gástrica (ADONAJO et al., 1975, 1976; PAWLOWSKI, 1980). Uma leucocitose moderada é

encontrada no período inicial, seguindo-se depois de leucopenia; eosinofilia de 6,00% a 34,00% (REY, 1991).

Nas regiões tropicais, a infecção com *Taenia saginata* pode ocorrer concomitantemente com outras verminoses, desnutrição ou ambas, complicando e agravando o quadro clínico.

4.1.2. - INFECÇÃO POR *TAENIA SOLIUM*

Em geral aceita-se que a sintomatologia e a patologia da teníase por *Taenia solium* seja menos evidente do que aqueles da *Taenia saginata*. O parasita adulto é menor, seus ganchos não danificam muito a mucosa intestinal, e as proglotes são menos ativas, não causando complicações tais como apendicites ou colites (GEMMELL et al., 1983). O quadro clínico, quando presente é semelhante ao produzido pela *Taenia saginata*. No entanto, as formas assintomáticas e benígnas são mais freqüentes. A grande importância clínica do parasitismo por *Taenia solium* é o fato do homem poder apresentar concomitantemente cisticercose pois há a possibilidade do paciente infectar-se com ovos de sua própria tênia, por via oral ou por regurgitamento de ovos ou proglotes até o estômago, adquirindo assim cisticercose. Na China foi relatado que 85 (53,80%) de 158 pacientes com cisticercose, tinham história prévia de infecção pelo parasita adulto (YINGKUN et al., 1979). Em inquérito sorológico por imunofluorescência indireta, em Maringá-Pr., dos pacientes soropositivos 22,1% relataram ter tido teníase (LONARDONI et al., 1996).

4.2. - AÇÃO DO CISTICERCO

4.2.1. - CISTICERCOSE HUMANA

A cisticercose humana é causada principalmente pela larva da *Taenia solium*, uma doença grave e crônica, geralmente fatal devido a freqüente localização cerebral do cisticerco.

Existem dois fatores principais que determinam o grau de sintomatologia associada com a cisticercose. O primeiro é a compressão mecânica e o deslocamento de tecidos causado pelo parasita e a interferência física no fluxo normal de líquidos, como por exemplo, quando está localizado em locais estratégicos do sistema de fluido cérebro-espinhal. O segundo é o processo inflamatório que geralmente circunda o parasita, e que pode, na verdade, se estender para estruturas vizinhas (GEMMELL et al., 1983).

No homem, os cisticercos tendem a localizar-se no tecido subcutâneo, globo ocular, músculos, tecido cerebral, cavidades dos ventrículos, grande cisterna abaixo da aracnóide. Estudos de autopsias no homem tem confirmado a presença de cisticercos da *Taenia solium* em muitos órgãos, incluindo medula espinhal, olhos, tecidos musculares, miocárdio, pulmões, cavidade peritoneal, submucosa intestinal, glândulas tireóide, tecido subcutâneo (GEMMELL et al., 1983).

Na América do Sul e sul da África, vários casos de cisticerco racemoso têm sido relatado. O termo *Cysticercus racemosus* é usado para descrever uma grande vesícula translúcida, freqüentemente lobulada ou ramificada, não tendo escólex e geralmente localizada no espaço subaracnoídeo ou nos ventrículos cerebrais. Estes cisticercos são encontrados somente no Sistema Nervoso Central (SNC) do homem.

Ele pode alcançar grande tamanho, tornar-se multilobulado e os sintomas exacerbados são mais freqüentes que o cisticerco normal. Talvez pelo seu grande volume são bem menos tolerados. A taxonomia do *Cysticercus racemosus* é controvertida, podendo ser um cisticerco de *Taenia solium* que degenerou, ou seu crescimento não foi obstruído pelos tecidos que o envolvem, ou poderia ser um tipo estéril de *Coenurus*, forma larvária da *Taenia multiceps*, *Taenia serialis*, ou outra *Taenia* (JUNG et al., 1981). A ocorrência, concomitantemente, em algumas pessoas, de *Cysticercus cellulosae*, *Cysticercus racemosus* e cisticercos em estágios intermediários de desenvolvimento, sugere que o *Cysticercus racemosus* é um estágio degenerativo do cisticerco da *Taenia solium* (RABIELA-CERVANTES et al., 1982).

4.2.1.1. - NEUROCISTICERCOSE

A localização do cisticerco no Sistema Nervoso Central, denominado de neurocisticercose, constitui a forma mais grave da doença. A presença do cisticerco no Sistema Nervoso Central provoca: efeito mecânico de compressão, destruição de tecidos, reação inflamatória, como resposta tissular do hospedeiro à presença do parasita (OPS/OMS, 1984).

A patologia clínica da cisticercose cerebral depende do número, localização e estágio biológico do parasita, bem como da reação individual do hospedeiro (PAWLOWSKI e SCHULTZ, 1972; TRELLES e TRELLES, 1978; ZENTANO-ALANIS, 1982).

O cérebro humano pode ser invadido por um ou por centenas de cisticercos (TRELLES e TRELLES, 1978). Na maioria dos casos menos que dez cisticercos estão presentes (BRICENO et al., 1961). Os cisticercos localizam-se

principalmente no córtex e meninges, nos ventrículos cerebrais e também na substância branca do cérebro. Na medula espinhal, localizam-se mais freqüentemente intramedular que extra-medular, representam em torno de 5% dos casos de cisticercose humana.

O estágio biológico do parasita é variável, podendo encontrar-se em fase pré-cística (vivo), fase cística (vivo), fase de cisto coloidal (provavelmente morto) ou em fase de calcificação (morto) (OPS/OMS, 1994).

A reação inflamatória pode ser mínima, moderada ou severa, focal ou difusa, podendo envolver os vasos e as meninges, pode ainda ser mista (OPS/OMS, 1994). As estruturas afetadas podem ser a leptomeninge, o encéfalo, a medula espinhal, o epêndimo, os vasos, os nervos.

Estes fatores variantes, fazem com que o quadro clínico possa manifestar-se de diversas formas, apresentando uma gama enorme de sintomas e sinais neurológicos. Porém, em geral existem duas formas de neurocisticercose: assintomática e sintomática. Nesta última os sintomas podem ser brandos como cefaléia, vertigem, nervosismo; ou graves como crises convulsivas, deterioração mental, hipertensão intracraniana, comprometimento de pares cranianos. A sintomatologia da cisticercose cerebral é caracterizada por três síndromes básicas: convulsões, hipertensão intracraniana e desordens psíquicas, ocorrendo separadamente ou em combinação. Na cisticercose espinhal os principais sintomas são desordens motoras ou sensoriais (TRELLES e TRELLES, 1978).

O prognóstico da cisticercose cerebral é sempre grave. A taxa de fatalidade em pacientes sintomáticos, não tratados, ultrapassa 50%. O tempo de

sobrevivência varia de poucos minutos até 35 anos, depois do aparecimento dos primeiros sintomas (GEMMELL et al., 1983).

4.2.1.2. - CISTICERCOSE OCULAR

Representa em torno de 20% dos casos humanos de cisticercose (GEMMEL et al., 1983). A localização mais comum dos cisticercos é no humor vítreo e no tecido sub-retinal. Pode também invadir a câmara anterior, conjuntiva e outros tecidos do olho. A reação do hospedeiro ao cisticerco varia de leve a severa inflamação com complicações tais como deslocamento ou atrofia de retina, cório-retinite e inflamação da íris (MESSNER e KAMMERER, 1979).

4.2.1.3. - CISTICERCOSE MUSCULAR E SUBCUTÂNEA

Cisticercos localizados no miocárdio do ser humano é comum em infecções maciças, mas raramente causam sinais clínicos. Da mesma forma quando localizados nos tecidos musculares e subcutâneos, são geralmente insignificantes clinicamente (GEMMEL et al., 1983).

4.2.2. - CISTICERCOSE ANIMAL

A importância da cisticercose animal é muito mais econômica e epidemiológica do que as conseqüências clínicas nos pacientes.

Os suínos portadores de cisticercos raramente manifestam sinais e sintomas de que estão parasitados. No entanto, em infecções maciças, podem apresentar respiração difícil e acelerada, rigidez das extremidades, sensibilidade do focinho e da língua, dificultando a ingestão de alimentos. Segue-se edema, debilidade geral e progressivo emagrecimento. Os cisticercos quando localizados no cérebro provocam movimentos convulsivos, ataques epiléptiformes e transtornos nervosos (BORCHERT, 1981). Devido ao ciclo de vida dos suínos ser relativamente curto, geralmente não há tempo suficiente para se avaliar os sintomas com profundidade.

No cão, quando os cisticercos localizam-se no cérebro provocam sintomas semelhantes aos da raiva (LAPAGE, 1981).

Nos bovinos, os cisticercos exercem pouco ou nenhum efeito. Na Austrália encontrou-se bovino com 30.000 cisticercos, estando o animal aparentemente normal. Estes animais, em desafios posteriores mostraram-se imunes (LAPAGE, 1981).

5. - EPIDEMIOLOGIA

O período de viabilidade dos ovos das tênias humanas é muito importante na epidemiologia da cisticercose, podendo variar de semanas a meses no meio ambiente. A infectividade destes ovos pode ser afetada por fatores climáticos tais como temperatura e umidade.

Na literatura existem vários registros quanto ao tempo de sobrevivência dos ovos no meio ambiente. Nas regiões altas do Quênia, em condições naturais, os ovos podem sobreviver por um período de até um ano (DUTHY e VAN SOMEREN, 1948). Todavia, em trabalho experimental, desenvolvido por KYVSGAARD et al., (1991), ovos de *Taenia saginata* submetidos as condições climáticas na superfície do solo por 42 semanas, não foram capazes de evoluir nem mesmo de induzir anticorpos específicos em bovinos. Nas repúblicas da Rússia, Azerbeidjão, Uzbequistão (SHESTAKOVA, 1955; RUKHOVA, 1963; ABDIEV, 1968; NADZHAFOV e CHOBANOV, 1973), foi observado que os ovos resistem melhor ao frio do inverno que o calor do verão. O mesmo foi observado na Dinamarca (JEPSEN & ROTH, 1952), onde os ovos sobreviveram por 58 dias no verão e 159 dias no inverno e primavera. A popularização do uso de detergentes impede a sedimentação, a putrefação e a oxidação, permitindo que os ovos dos parasitas sobrevivam a estes processos (SILVERMAN e GRIFFITHS, 1955). Quando dejetos humanos são lançados em estuário de rios, as proglotes de tênia podem ficar dispersas nas margens e posteriormente os ovos serem disseminados pelas aves nas pastagens (GEMMELL e LAWSON, 1982). Outros agentes de manutenção e propagação dos ovos de tênias são as moscas dos gêneros *Chrysomyia* e *Sarcophaga*. Estas moscas são capazes de evacuar ovos de *Taenia saginata* pelo período de até 11 dias após ingestão dos mesmos (ROUND, 1961). Estudos em zonas endêmicas demonstraram que 4,80% de 4372 moscas levavam ovos de tênias em seu corpo ou intestinos (NADZHAFOV, 1967).

A longevidade dos cisticercos não é uniforme e varia segundo a reação imunológica do hospedeiro, local em que está alojado, idade do animal no momento da infecção e grau de infecção.

Nos bovinos, os cisticercos localizados nos músculos estriados começam a degenerar algumas semanas após a infecção e aos nove meses a muitos deles estão mortos e calcificados. Nos pulmões, fígado e coração os cisticercos da *Taenia saginata* podem degenerar-se após vinte dias de contraída a infecção (SOULSBY, 1963). Como consequência da formação de uma forte cápsula pelo hospedeiro, o cisticerco morre. Logo se produz necrose de coagulação da vesícula caudal com posterior caseificação e calcificação, podendo adquirir coloração esverdeada. Nos bovinos os cisticercos caseificados ou calcificados encontram-se principalmente no coração e nas vísceras.

Em pesquisas realizadas, foi demonstrado que bezerros que contraem a infecção nos primeiros meses de vida não desenvolvem reação imunológica eficaz, diferenciando-se daqueles que são infectados quando têm mais idade (SOULSBY, 1961). Nos bovinos adultos a musculatura cardíaca é parasitada mais raramente em comparação com bezerros e lactentes infectados. Por sua vez, os bovinos jovens apresentam simultaneamente infecção cardíaca e nos locais preferencialmente parasitados dos animais adultos. Quando ocorre infecção neonatal em bovinos, os animais tornam-se tolerantes e a larva pode sobreviver durante toda a vida do animal.

Com o incremento da criação de bovinos confinados, onde se aumenta o manuseio dos alimentos e dos animais por parte dos trabalhadores, crescem as possibilidades de ocorrer infecção por ovos de *Taenia saginata* em grande número de animais, muitas vezes observa-se infecções maciças. A utilização de fezes humanas, na forma de borra, não tratada, para fertilizar solos de pastagens é uma porta aberta para levar ovos de *Taenia saginata* até os rebanhos. Da mesma forma,

a utilização de água para beber e às vezes para irrigação, oriunda de rios ou riachos que recebem dejetos humanos das cidades, é uma fonte potencial de infecção.

As áreas de maior endemia por *Taenia saginata* incluem países da África Central (Etiópia, Quênia, Zaire), das regiões endêmicas do Cáucaso e repúblicas do centro-sul da extinta União Soviética e do Mediterrâneo (Síria, Líbano, Iugoslávia). Moderada prevalência há na Europa, sudeste da Ásia (Tailândia, Índia, Vietnã, Filipinas), Japão e América do Sul. Baixa prevalência é encontrada nos Estados Unidos da América do Norte, Canadá, Austrália e alguns países do pacífico ocidental.

A prevalência da *Taenia solium* varia grandemente de acordo com o nível regional de sanidade, padrões de criação de suínos e hábitos alimentares. Ela é endêmica na América Latina, no sul da África e nas populações não islâmicas do sudeste da Ásia. A *Taenia solium* é importante em alguns países que consomem carne suína e está principalmente restrita a regiões de baixo desenvolvimento social e econômico (MAHAJAN, 1982; PAWLOWSKI, 1984).

CAPÍTULO II

INFECÇÃO EXPERIMENTAL

TESTE DE ELISA PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA CISTICERCOSE BOVINA

1.- INTRODUÇÃO

Uso de procedimentos imunológicos com relação a cisticercose está baseado, fundamentalmente, na detecção de anticorpos e raramente na de antígenos. Ao se elaborar um teste diagnóstico, baseado na pesquisa de anticorpos, deve-se considerar a diversidade genética do hospedeiro, as variações temporais da evolução do parasita e da própria infecção e conhecer a cinética da resposta imune (PARKHOUSE e HARRISON, 1979; VAZ, 1993). Várias técnicas imunológicas têm sido empregadas para estudar o comportamento imunológico de bovinos infectados com cisticercos.

A técnica de ELISA é uma das mais adequadas para o diagnóstico de rotina em laboratório pelo baixo custo, por poder trabalhar com grande número de amostras e com a vantagem da leitura ser automatizada. O método de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay foi descrito por ENGVALL e PERLMANN (1971) e sua aplicação no diagnóstico da cisticercose humana aconteceu pela primeira vez em 1978 por ARAMBULO et al., obtendo positividade comparável à hemaglutinação passiva.

Os ensaios com ELISA para imunodiagnóstico da cisticercose bovina, até o presente, têm restrições especialmente quanto a sensibilidade e especificidade.

Este trabalho visa estudar a cinética da resposta imune de bovinos frente a infecção experimental por ovos de *Taenia saginata*.

Para atingir o objetivo proposto as seguintes etapas foram desenvolvidas:

- 1- Infecção experimental de bovinos com ovos de *Taenia saginata*.
- 2- Produção de antígenos a partir de *Cysticercus bovis* e *Cysticercus cellulosae*.
- 3- Padronização da técnica de ELISA estabelecendo a concentração ideal de antígeno por pocinho, diluição do conjugado e dos soros.
- 4- Estabelecimento do “cut-off”.
- 5- Estabelecimento da cinética de produção de anticorpos frente a infecção experimental.
- 6- Avaliar a aplicabilidade da prova de ELISA para determinação de anticorpos anti-*Cisticercus bovis* como método diagnóstico em matadouro.

2- METODOLOGIA

2.1.- MATERIAIS

Todos os reativos e equipamentos estão listados em anexo1.

2.2- MÉTODOS

2.2.1. - INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE BEZERROS COM OVOS DE TAENIA SAGINATA

2.2.1.1. -OBTENÇÃO DOS OVOS

Proglotes grávidas contendo ovos de *Taenia saginata* foram obtidas de pacientes não tratados com anti-helmínticos, junto aos laboratórios de análises clínicas Frichaman - Aisengard e Laboratório Municipal de Curitiba, no período de janeiro a abril de 1994. Em torno de 20 proglotes grávidas foram identificadas como sendo de *Taenia saginata*, por meio da técnica de compressão das mesmas entre lâminas e análise ao microscópio das ramificações uterinas: 15 a 30 ramificações dicotômicas. As proglotes identificadas foram dilaceradas, com auxílio de estilete, e os ovos suspensos em solução de NaCl 0,85%. Em câmara de contagem (Neubauer) estimou-se o número de ovos. Aliquotas de 2×10^4 ovos foram colocadas em tubos de ensaio com 40 ml de solução salina.

2.2.1.2 -ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Bezerros recém nascidos da raça Hosltein - friziam, foram adquiridos do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR) e da Cooperativa de Leite de Curitiba (CLAC). Os animais foram criados e mantidos no Centro de Produção e Pesquisas de Imunobiológicos (CPPI). Inicialmente foram alimentados com leite em pó, aos poucos foram sendo introduzidos feno de alfafa e ração peletizada, posteriormente gramíneas e leguminosas cultivadas no CPPI. Foram infectados com ovos de *Taenia saginata* quatro bezerros e um quinto animal não foi infectado para servir como controle.

2.2.1.3. - INFECCÃO

Dos quatro bezerros infectados três possuíam 6,5 meses e um 19 meses de idade no momento da infecção. Cada animal recebeu, por via oral com auxílio de uma seringa plástica, 2×10^4 ovos de *T. saginata*. O número de ovos e a idade dos bezerros são compatíveis com SMITH et al., (1987). Seguindo-se a inoculação os animais permaneceram em baias individuais por um período de 120 horas. Por medidas de precaução, neste período, foram recolhidos fezes e outros dejetos, os mesmos foram depositados em esterqueira para fermentação e decomposição de matéria orgânica. Das fezes e outros dejetos dos animais infectados, diariamente, pelo período de 5 dias , realizou-se pesquisa de ovos de *Taenia saginata* pelo método de sedimentação simples (HOFFMANN, 1987). Os resultados foram negativos. Após o término dos trabalhos, roupas e outros materiais foram autoclavados. Depois da retirada dos animais das baias, as mesmas foram

higienizadas, removendo-se fezes e outros dejetos. No piso, divisórias, paredes e cochos passou-se lança chamas.

2.2.1.4. - AMOSTRA DE SOROS

Para acompanhar a soroconversão dos bovinos infectados, amostras de soros, de todos os animais do experimento, foram colhidas 97 dias antes da inoculação, no dia zero (que corresponde ao dia da infecção) e semanalmente até o abate (90 a 111 dias após infecção). O sangue dos bovinos foi obtido através de punção da jugular com agulha 40 x 16, colhido em tubo de ensaio 2 x 20 cm. Depois de colhido o sangue, o tubo de ensaio foi colocado em banho-maria a 37°C por quatro horas. A seguir, por inversão do tubo de ensaio, separou-se o soro, o qual foi centrifugado a 5.000 rotações por minuto (RPM) durante três minutos. A seguir as amostras de soro foram armazenadas a - 30°C (30 graus Célcus negativos).

2.2.1.5. - ABATE DOS ANIMAIS

Os animais infectados e o animal controle foram sacrificados em frigorífico com inspeção federal, sob as mesmas condições de abate de outros animais. O abate ocorreu em três etapas aos 90, 104 e 111 dias após a infecção. No frigorífico fez-se a inspeção de rotina. As carcaças e órgãos, exceto vísceras intestinais, foram transportadas para o CPPI, onde procedeu-se minuciosa inspeção.

2.2.1.6. - NECROPSIA E INSPEÇÃO DE MUSCULATURA E ÓRGÃOS

Toda a musculatura e órgãos dos animais foram fatiados com intervalo de 5 mm, em conformidade com os trabalhos de FAN et al., (1989); HAYUNGA et al., (1991); KYVSGAARD et al., (1991); SMITH et al., (1991); FAN et al., (1992).

2.2.1.7. - IDENTIFICAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DOS CISTICERCOS

RECUPERADOS.

Os cisticercos recuperados durante a necropsia foram classificados como vivos e degenerados. Vivos podendo ser: imaturos, quando possuíam coloração esbranquiçada, forma pastosa, não se distinguindo protoescólex e quando submetido ao processo de desinvaginação esta não ocorria; maduros, continham protoescólex e quando submetidos ao processo de desinvaginação a mesma ocorria. Degenerados podendo ser: caseosos, quando apresentavam conteúdo pastoso de coloração amarelada; calcificados, quando apresentavam interiormente material sólido, perceptível ao tato, especialmente quando o cisticerco era cortado.

A identificação dos cisticercos efetuou-se através do processo de desinvaginação dos que estavam vivos.

A desinvaginação foi realizada submetendo-se os cisticercos à ação de sucos digestivos de forma semelhante ao que ocorre no homem quando este ingere-os. Também tem por base os relatos de ROTHMAN, (1959), que assinala que a pepsina e sais biliares são necessários para a desinvaginação; CAÑEDO et al., (1982), observaram que 82% dos cisticercos intactos submetidos a ação da bile desinvaginavam-se, porém se a parede era, previamente cortada esta ocorria em 56%. Estes autores assinalam ainda que a tripsina foi 100% efetiva em cistos

cortados, porém foi totalmente ineficiente em cistos intactos. Neste trabalho foi desenvolvida uma técnica de desinvaginação empregando conteúdos digestivos dos próprios bovinos. Para tanto, os cisticercos dissecados da carcaça bovina eram submetidos em seqüência a ação dos sucos abomasal e biliar, colhidos no momento do abate. Utilizando-se uma peneira de malha fina filtrou-se o suco abomasal, separando-se a fase líquida, a qual foi acondicionada em frasco de vidro, desprezando-se a fase sólida. Dos cisticercos dissecados das carcaças removeu-se a membrana adventícia (camada externa de tecido inflamatório do hospedeiro). Verificou-se que, submetendo os cisticercos a ação do suco abomasal, por 45 minutos, a 37 ° C e, em seguida, suco biliar a 37 ° C, por 5 a 15 minutos, o processo de desinvaginação completava-se e a larva apresentava movimentos. O ensaio, nestas condições, foi realizado 11 vezes, num total de 30 cisticercos, verificando-se 100% de desinvaginação.

O processo de desinvaginação ocorreu seguindo uma ordem gradual de acontecimentos: abertura do canal espiral, desinvaginação das estruturas invaginadas começando com a superfície mais próxima da abertura externa do canal espiral, seguindo-se pelas pregas transversais do canal espiral, escólex, colo e pseudo-estróbilo. Os cisticercos desinvaginados apresentam uma série de movimentos concomitantes, que serão descritos separadamente, de acordo com o componente estrutural envolvido. O conduto do canal espiral, abaixo do pseudo-estróbilo caracterizou-se por movimentos ativos laterais, circulares, bem como, por retração e protusão telescópica. Posteriormente, permitiu ao cisticerco reinvaginar-se na região do canal espiral, fechando a parede da vesícula. O tronco (pseudo-estróbilo e colo) apresentou movimentos circulares, laterais, de alongamento e

retração, promovendo motilidade adicional ao escólex. Os movimentos do tronco foram independentes daqueles do canal espiral. O escólex inerte apresentou um padrão repetitivo de atividades de suas quatro ventosas. Inicialmente, os movimentos das ventosas foram contráteis, muito semelhantes aos dos esfíncteres musculares. Estas contrações esfíncterianas controlam o diâmetro da abertura das ventosas. Outros tipos de movimentos foram executados por músculos posteriores àqueles circundando a abertura das ventosas, consistindo por rítmicas e independentes contrações que tem efeito de estender as ventosas, deslocando-as para longe do centro do escólex.

Identificou-se como *Cysticercus bovis*, os cisticercos desinvaginados que possuíam quatro ventosas, depressão ventosiforme no protoescólex e segmentações do pseudo-estróbilo. Os cisticercos que não se desinvaginaram, os caseosos e os calcificados, foram considerados como *Cysticercus bovis* apesar de sua identidade não ser precisa.

2.2.2. - TESTE DE ELISA PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA CISTICERCOSE BOVINA

2.2.2.1. - PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS

O presente ensaio envolve a análise comparativa de três antígenos:

- EXTRATO SALINO PARCIAL DE *CYSTICERCUS CELLULOSAE*;
- EXTRATO SALINO TOTAL DE *CYSTICERCUS BOVIS*;
- ANTIGENO TOTAL DE *CYSTICERCUS LONGICOLLIS*.

2.2.2.1.1. - EXTRATO SALINO PARCIAL DE *CYSTICERCUS CELLULOSAE*

O extrato salino total de *Cysticercus cellulosae* foi obtido conforme metodologia descrita por COSTA, (1986), com algumas modificações.

Os cisticercos foram obtidos da musculatura de suínos portadores de infecção natural. Tomou-se o cuidado de excluir totalmente a membrana adventícia do cisticerco, constituída de tecido inflamatório do hospedeiro. Com auxílio de um bisturi, retirou-se também parte da membrana do parasita. Isolando-se, desta forma, o metacestoda constituído pelo escólex, colo, pseudo-estróbilo aderidos em parte da membrana parasitária. A seguir, os cisticercos foram exaustivamente lavados em solução salina, posteriormente dessecados, em dessecadores, à temperatura de - 20°C. Após a dessecação dos cisticercos, as seguintes etapas foram realizadas para obtenção do antígeno:

1. Colocar 200 cisticercos dessecados em um gral, envolto em gelo, e com auxílio de um pistilo, homogeneizar.
2. Acrescentar, aos poucos, a metade do volume de água destilada estéril gelada a ser utilizada na homogeneização (para cada 200 cisticercos 20 ml de água destilada).
3. Colocar, aos poucos, o homogeneizado do gral, no tubo homogeneizador de tecidos (mantendo sempre o material em gelo).
4. Homogeneizar completamente todo material e colocá-lo em becker de 250 ml.
5. Proceder a sonicação (sonicador de 20 Khz, 1 mA) por período de 30 segundos com intervalo de 30 segundos, por quatro vezes. O becker deve sempre estar emergido em gelo.

6. Isotonizar a mistura com solução salina 0,3 molar (gelada), colocando igual volume do material obtido anteriormente.
7. Proceder novamente a sonicação por período de 30 segundos com intervalo de 30 segundos, por quatro vezes.
8. Colocar o material em becker de 250 ml, deixar em agitação (agitador magnético), sob refrigeração em temperatura, de 2 a 8 ° C (geladeira), por 18 horas ou “over night”
9. Distribuir o material em tubos de centrífuga, previamente resfriados, e centrifugar a 9.000 R.P.M., por 30 minutos a 4 C° (4 tubos de 50 ml). Colocar, por inversão, o sobrenadante em outros tubos ou em becker de 250 ml com gelo.
10. Lavar bem com água destilada os tubos utilizados na primeira centrifugação, utilizando-os para a segunda centrifugação. Centrifugar a 15.000 R.P.M., por 30 minutos. Retornar o sobrenadante para um balão de 500 ml.
11. Homogeneizar bem o balão com o antígeno, retirar 03 ml para dosagem de proteínas, segundo o método de LOWRY, 1951. Aliquotar todo o antígeno em frasco-ampolas (01 ml em cada frasco).
12. Liofilizar.
13. Rotular o antígeno, anotando o número do lote, data de fabricação, concentração protéica. Armazenar em 30°C negativos.

2.2.2.1.2. - EXTRATO SALINO TOTAL DE *CYSTICERCUS BOVIS*

O antígeno foi produzido de forma idêntica ao do *Cysticercus cellulosae*, descrito no item 2.2.2.1.1, com a exceção de excluir apenas a camada externa de

tecido inflamatório do hospedeiro, preservando assim o líquido vesicular e a totalidade da membrana parasitária. Outra diferença foi, no final do processo, devido seu uso imediato, optou-se por estocar em freezer, sem liofilizar.

Os *Cysticercus bovis* utilizados no presente experimento, foram extraídos da musculatura e órgãos de bovinos experimentalmente infectados.

Partiu-se de 200 cisticercos dessecados. Obteve-se no final do processo de produção 30 frascos de 01 ml de solução antigênica. Feita a dosagem de proteínas pelo método de LOWRY, (1951), verificou-se concentração protéica de 0,39 mg por ml.

2.2.2.1.3. - ANTÍGENO TOTAL DE *CYSTICERCUS LONGICOLLIS*

O antígeno de *Cysticercus longicollis*, larva da *Taenia crassiceps*, foi produzido no Instituto Adolfo Lutz, de acordo com a metodologia descrita por FREEMAN, (1962); VAZ, (1993). Amostra do antígeno utilizado apresentou concentração proteica de 4,8 mg por ml. Este antígeno foi, gentilmente, cedido pelo Médico Veterinário Paulo Sérgio de Arruda Pinto.

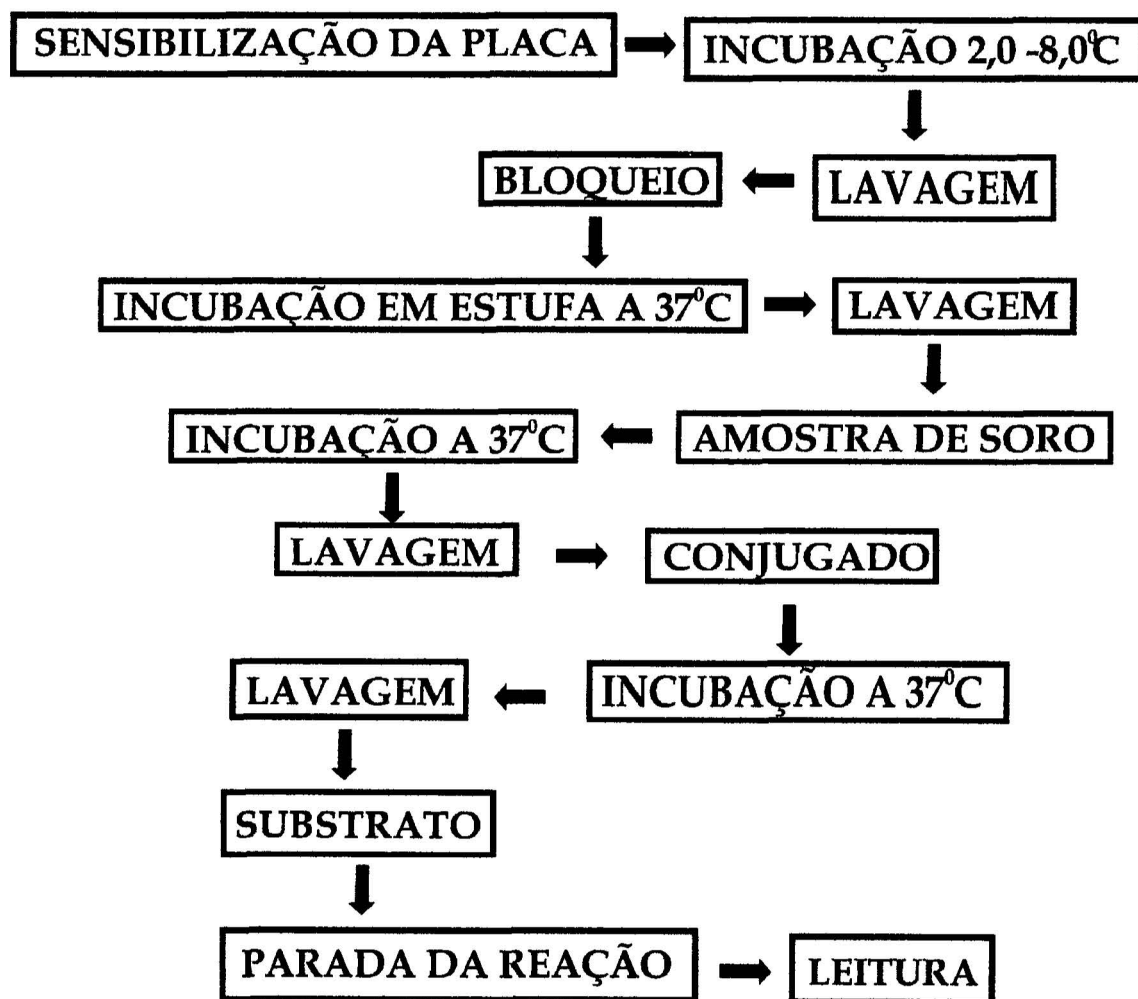
2.2.2.2. - PRODUÇÃO DO CONJUGADO

O conjugado utilizado no presente trabalho foi anti-IgG bovina produzida em cabra, conjugadas com a enzima peroxidase (IgG de goat anti-IgG de bovino). O conjugado foi produzido na Fundação Esequiel Dias (FUNED), gentilmente cedido pelo professor Dr. Carlos Chávez-Olórtegui.

2.2.2.3. - CONDIÇÕES GERAIS DO TESTE DE ELISA

O princípio da técnica de ELISA é uma reação de cor. A coloração faz-se presente quando a enzima peroxidase, integrante do conjugado, desdobra o substrato (OPD). Para que haja manifestação de cor, é necessário que ocorram uma série de eventos em sequência. Estes eventos tem início com a sensibilização da placa com o antígeno até a aferição da cor pelo leitor de ELISA.

DIAGRAMA DA PROVA DE ELISA



2.2.2.3.1. SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA O TESTE DE ELISA

Todas as soluções utilizadas durante a realização da prova de ELISA estão descritas em anexos (anexo2).

2.2.2.3.2. SENSIBILIZAÇÃO DA PLACA

Sensibilização é o processo de fixação, neste caso, do antígeno na placa. A quantidade de antígeno por “weel” é baseada na concentração proteica do antígeno utilizado. Inicialmente é fixado a quantidade de antígeno por “weel”. De posse da concentração proteica do antígeno, faz-se a diluição do mesmo em solução de “coating buffer”. Com auxílio de multipipetador faz-se a homogeneização e distribuição da solução antigênica na placa. Coloca-se 100 µl da solução de antígeno por “weel”, com exceção da primeira coluna (branco). A placa sensibilizada é deixada em geladeira “over night”. Nesta etapa e nas seguintes, durante o período em que a placa estiver em incubação, a mesma é protegida de dessecação e de sujidade por uma tampa plástica.

Utilizou-se placas Hemobag (Campinas, São Paulo-Brasil), constituída de 96 “weels” (12 colunas com 08 “weels” em cada).

2.2.2.3.3 - PRIMEIRA LAVAGEM

Tem a finalidade de remover o antígeno que não se fixou na placa. Utiliza-se a solução de lavagem (0,05% Tween-salina) descrita no item 7.2.2. Preenche-se completamente os pocinhos da placa com solução de lavagem, remove-se o conteúdo. Esta operação é feita duas vezes.

2.2.2.3.4. - BLOQUEIO DA PLACA

Bloqueia-se toda a placa, com 100 µl por well da solução de bloqueio (caseína 2%; 0,05% Tween 20; diluídas em PBS) descrita no item 7.2.3. Incuba-se a mesma em estufa, a 37 °C, por 60 minutos. O bloqueio tem por finalidade, ocupar espaços em branco nos pocinhos da placa, deixados no processo de sensibilização.

2.2.2.3.5. - SEGUNDA LAVAGEM

A finalidade desta lavagem é remover proteínas da solução de bloqueio que não se fixaram na placa. Proceda-se de forma semelhante a primeira lavagem.

2.2.2.3.6. - DILUIÇÃO DOS SOROS

Como fonte de primeiro anticorpo foram utilizados soros de bovinos portadores de cisticercos natural ou experimentalmente infectados. Os soros foram diluídos em tampão de incubação (PBS; 0,25% caseína; 0,05% de tween 20) conforme descrito no item 7.2.4. Várias diluições foram feitas buscando estabelecer a melhor concentração. Inicialmente descongelou-se o soro e fez-se diluição de 100 vezes em tampão de incubação. Com finalidade de diminuir erros de diluição e ter volume suficiente para fazer o teste em duplicata e quando se fizesse necessário repeti-lo, foi preparado em um tubo de ensaio volume correspondente a 01 ml. Tomando-se para isso 10 µl de soro e 990 µl de tampão de incubação. Em cada pocinho colocou-se 100 µl de soro diluído. Na primeira coluna não foi colocado amostra do soro, sendo a mesma utilizada para fazer o branco do aparelho. Depois de distribuir o soro na placa a mesma foi incubada por 60 minutos em estufa a 37 °C.

C. A finalidade desta etapa é fazer a ligação do antígeno fixado na placa com anticorpos específicos, presentes no soro de bovinos portadores de cisticercose.

2.2.2.3.7. - TERCEIRA LAVAGEM

Esta lavagem destina-se a remover anticorpos que não estão ligados aos antígenos fixados na placa, bem como outras substâncias presentes no soro. Esse processo é mais rigoroso que as lavagens anteriores, pois se continuar presente nos pocinhos, pequenos resquícios do soro, poderá alterar significativamente o resultado final do teste. Para isso preenche-se completamente todos os pocinhos, com solução de lavagem para ELISA. A seguir, despreza-se todo o conteúdo da placa. Este procedimento é repetido seis vezes.

2.2.2.3.8. - DILUIÇÃO DO CONJUGADO

O segundo anticorpo adicionado na placa consiste de imunoglobulinas heterólogas. De forma semelhante ao soro, o conjugado foi diluído em tampão de incubação. Vários testes foram feitos para descobrir a diluição ideal do conjugado a ser utilizado nos testes. Inicialmente descongela-se o conjugado, a seguir dilui-se em tampão de incubação. Distribui 100µl em todos os pocinhos da placa com a exceção da primeira coluna na qual não é colocado o conjugado. Para tanto, foi preparado 10 ml de solução, diluindo 25µl de conjugado em 9.975 µl de tampão de incubação. Depois da distribuição do conjugado na placa, a mesma é incubada em estufa a 37C°, por 60 minutos.

2.2.2.3.9. - QUARTA LAVAGEM

Esta lavagem, tem por finalidade remover todo conjugado, que não estiver ligado a moléculas de anticorpos nos pocinhos da placa. Qualquer resquício do conjugado alterará completamente os valores da reação.

2.2.2.3.10. - SUBSTRATO

A atividade enzimática é revelada usando-se como substrato a solução de ortofenilenodiamino (0,20 mg/ml em tampão citrato pH 5,0; na presença de 0,02% de peróxido de hidrogênio). O ortofenilenodiamino (OPD) é a substância na qual a enzima peroxidase vai atuar resultando na formação de cor. Utiliza-se H_2O_2 como catalisador e o veículo é tampão citrato pH 5,0. Em cada pocinho coloca-se 100 μ l da solução contendo 20 μ g de OPD. Para preparar a solução, pipeta-se 10 ml de tampão citrato. A esta adiciona-se uma pastilha de 02 mg de OPD, 02 μ l de H_2O_2 . Deixa-se a solução ao abrigo da luz até o OPD se dissolver. Põe-se em toda a placa, 100 μ l da solução por well. Depois de distribuir a solução de OPD na placa, a mesma é incubada por 15 minutos, em temperatura ambiente, protegida da luz.

2.2.2.3.11. - PARADA DA REAÇÃO

Para manter uniformidade de tempo de reatividade enzima - substrato, após 15 minutos de incubação, a reação é interrompida pela adição em todos os pocinhos de 20 μ l da solução de H_2SO_4 a 5 %. A partir deste momento a enzima peroxidase deixa de atuar sobre o substrato, podendo-se levar a placa para proceder a leitura.

2.2.2.3.12. - LEITURA

As leituras da absorbância foram feitas a 492 nm, em um leitor de ELISA TITERTEK multiscan MCC/340P VERSÃO 2.20.

O leitor de placa deve ser ligado, no mínimo, 10 minutos antes da leitura para que o aparelho faça autocalibração. Este procedimento é realizado imediatamente depois de colocar a solução de OPD na placa. Depois de interromper a reação, com adição de 20µl/pocinho de H₂SO₄, procede-se a leitura.

2.2.2.4. - CUT-OFF

Os testes imunológicos podem ser apenas qualitativos (desencadear um sinal) ou também quantitativos, que se exprime em um título. Define-se como título de uma solução (soro, líquido cefalorraquiano, sangue, ou outros fluídos pesquisados) a maior diluição da mesma capaz de desencadear o sinal de positividade. Esta diluição corresponde ao “ponto de viragem” ou “end-point” da reação. Os títulos dos soros de uma população com diagnóstico verdadeiro de uma doença, normalmente se distribuem segundo uma curva que lembra a curva de uma distribuição normal (FIGURA 2, curva B). Os títulos médios correspondem à maior frequência e os mais altos e mais baixos, a frequências progressivamente menores.

Quando se pesquisa os verdadeiros negativos, ou seja, não portadores da afecção, temos uma curva semelhante, porém com níveis médios sensivelmente inferiores (FIGURA 2, curva A). A área comum às duas curvas, dependendo do teste, pode ser maior ou menor. Nesta, a reatividade representada pela curva A, decorre de reações inespecíficas devidas a anticorpos de resposta a estímulos antigênicos os mais variados, às variáveis não controláveis, por apresentarem um ou mais

determinantes antigênicos comum com o agente infeccioso. A área comum representada pela curva B, corresponde às reações específicas. É a situação de discriminar doentes de não doentes, ou seja, título diagnóstico. Este corte ou “cut-off” pode ser colocado, arbitrariamente em diferentes níveis (figura 3). Para o “cut-off” na posição “X”, temos o máximo de sensibilidade e o mínimo de especificidade do teste. Para o “cut-off” em “Z”, a especificidade é máxima e a sensibilidade é mínima. O “cut-off” em “Y”, é um equilíbrio entre ambos, representando a máxima sensibilidade para especificidade máxima. A escolha do “cut-off” dependerá dos objetivos a que o teste se destina. Quando desejamos identificar todos os indivíduos portadores da doença pesquisada, usamos o “cut-off” com a sensibilidade máxima e especificidade reduzida, ciente neste caso, que existirão uma percentagem significativa de falsos positivos. Quando o objetivo é o diagnóstico clínico, deve-se usar “cut-off” com especificidade máxima, mesmo que para isso tenha sensibilidade reduzida.

Pelas FIGURAS 2 e 3, vê-se que o resultado de um teste sorológico tem valor diagnóstico de probabilidade. Ou seja, a probabilidade de que um resultado considerado positivo corresponda a doença, é maior quanto mais alto for o título. Inversamente, para um resultado considerado negativo, a probabilidade de não doença é maior quanto mais baixo for o título.

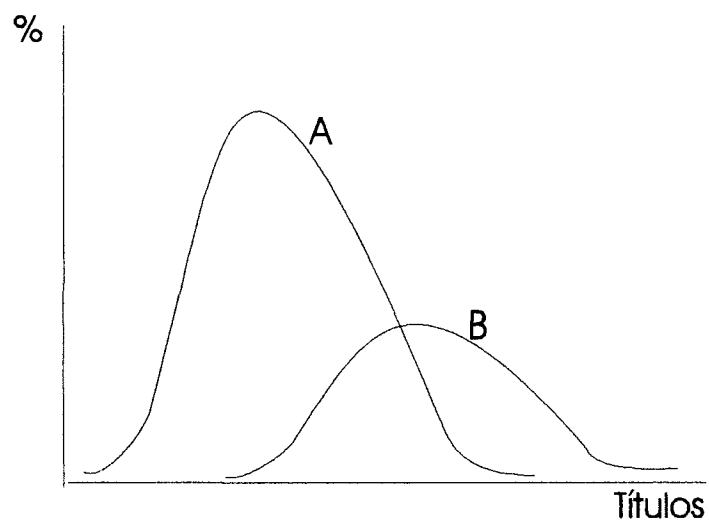


FIGURA 2. - CURVAS DE DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DE TÍTULOS DE PACIENTES COM DIAGNÓSTICO VERDADEIRO: A) - NÃO INFECTADOS
B) - INFECTADOS

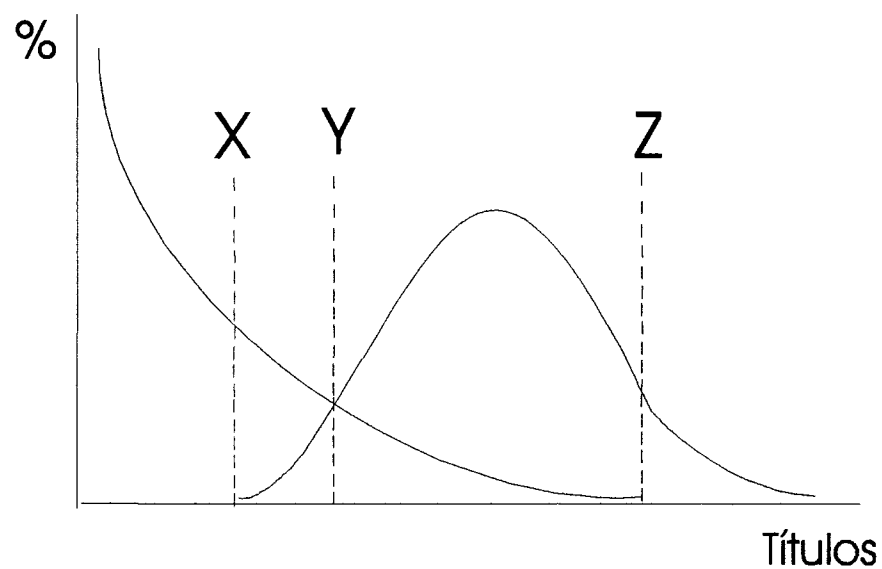


FIGURA 3. - DIFERENTES CORTES DISCRIMINATÓRIOS ENTRE TESTES POSITIVOS E NEGATIVOS.

Limiar de reatividade ("cut-off") do teste de ELISA foi calculado para o antígeno extrato salino parcial de *Cysticercus cellulosae*. Para estabelecer o "cut-off" foi utilizado a média aritmética dos valores de absorbância, a esta acrescentou-se o valor de três desvio padrão da média.

Em função da finalidade a que o teste se destina pode-se alterar a fórmula de calcular o "cut-off". Neste trabalho definimos como a média mais três vezes o desvio padrão da média. Poderíamos ter calculado agregando-se a média mais duas vezes o desvio padrão, tornando-o de menor valor, desta forma mais sensível, porém, menos específica. Poder-se-ia também, estabelecer o "cut-off" agregando-se à média mais quatro vezes o valor do desvio padrão, com valor superior a prova seria mais específica, porém, menos sensível (SMITH, 1991).

3. - RESULTADOS

3.1. - INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Quatro bezerros receberam por via oral, cada um, 2×10^4 ovos de *Taenia saginata*. Um quinto animal não recebeu ovos, para servir como soro negativo. Os animais foram abatidos com 90, 104, 111 dias depois da infecção. O abate foi feito no Frigorífico Argus, localizado no município de São José dos Pinhais - Pr.

Após o abate de rotina realizou-se o fatiamento de todos os órgãos e musculatura dos animais. Todos os cisticercos encontrados foram recolhidos, posteriormente classificados como vivos ou degenerados e os vivos foram então identificados. Registrou-se de cada animal o número, localização e estágio biológico dos cisticercos. O número total de cisticercos recuperados, nos quatro animais infectados experimentalmente, foi de 702. Destes, 570 (81,20%) eram vivos e 132 (18,80%) eram degenerados (FIGURA 4, TABELA 1).

TABELA 1 - CISTICERCOS VIVOS E DEGENERADOS RECUPERADOS DE BOVINOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM OVOS DE TAENIA SAGINATA.

CÓDIGO DO ANIMAL	NÚMERO DE OVOS POR ANIMAL	IDADE NA INOCULAÇÃO	DIAS DE INFECÇÃO	CISTICERCOS RECUPERADOS		
				VIVOS	DEGENERADOS	TOTAL
01	20.000	197 dias	111	568	17	585
03	20.000	193 dias	90	0	104	104
04	20.000	202 dias	90	02	09	11
09	20.000	570 dias	104	0	02	02



FIGURA 4 - FÍGADO COM MANCHAS DE MIGRAÇÃO VERMINÓTICA

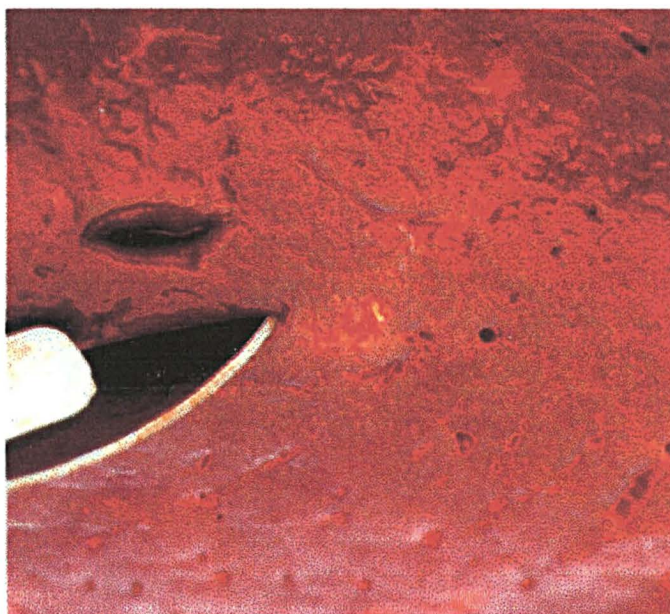


FIGURA 5 - CORTE DE FÍGADO COM MANCHAS DE MIGRAÇÃO VERMINÓTICA

Os cisticercos encontrados nos bovinos infectados com ovos de *Taenia saginata* apresentaram a seguinte distribuição anatômica: órgãos profundos 104 (14,81%) e musculatura esquelética 598 (85,19%), (TABELA 2).

TABELA 2 - NÚMERO TOTAL DE CISTICERCOS RECUPERADOS POR ÓRGÃO E MUSCULATURA ESQUELÉTICA, DE BOVINOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM OVOS DE *TAENIA SAGINATA*.

REGIÃO ANATÔMICA	% NO TOTAL
CORAÇÃO	49 (6,98%)
DIAFRAGMA	18 (2,56%)
PULMÕES	15 (2,14%)
FÍGADO	12 (1,71%)
LÍNGUA	07 (1,00%)
RINS	03 (0,43%)
MUSCULATURA DIANTEIRO	323 (46,00%)
MUSCULATURA TRASEIRO	248 (35,33%)
CABEÇA	27 (3,85%)

A distribuição anatômica dos cisticercos recuperados variou de um animal para outro. Todavia o maior número de cistos foi encontrado na musculatura esquelética dianteira (TABELA 3).

TABELA 3 - CISTICERCOS ENCONTRADOS EM ÓRGÃOS E MUSCULATURA ESQUELÉTICA DE BOVINOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM OVOS DE TAENIA SAGINATA.

CÓDIGO DO ANIMAL	ÓRGÃO						MUSCULATURA ESQUELÉTICA		
	CORAÇÃO	FÍGADO	PULMÕES	LÍNGUA	RINS	DIAFRAGMA	DIANTEIRO	TRASEIRO	CABEÇA
1	25	8	15	6	2	15	284	204	26
3	22	3	-	1	-	3	35	39	1
4	1	1	-	-	-	-	4	5	-
9	1	-	-	-	1	-	-	-	-

O bovino N° 9 (adulto) apresentou somente 02 cisticercos calcificados, entretanto foram encontradas, aproximadamente, 300 manchas verminóticas na superfície e parênquima hepático. A presença das manchas verminóticas indica que o processo inicial da infecção ocorreu, mas, a barreira hepática foi eficiente para impedir o desenvolvimento normal dos cisticercos.

Os cisticercos recuperados e que estavam vivos tiveram três destinos:

1. dessecados para produção de antígeno do teste de ELISA;
2. desinvaginados e feito lâminas para microscopia óptica (PESSOA e MARTINS, 1987), para identificação;
3. desinvaginados e fixados para microscopia eletrônica de varredura com o objetivo de confirmar a identificação.

Na microscopia ótica foi possível visualizar o protoescólex, colo e pseudo-estróbilo. No protoescólex identificou-se as 04 ventosas e a depressão ventosiforme confirmando ser *Cysticercus bovis* (FIGURA 6). Procedeu-se a medição das estruturas componentes do protoescólex (HOFFMANN, 1987). Os valores médios estão contidos na TABELA 4.

TABELA 4 - DIMENSÕES MÉDIAS DOS CISTICERCOS DESINVAGINADOS E IDENTIFICADOS COMO *CYSTICERCUS BOVIS*, OBTIDOS DE BOVINOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM OVOS DE *TAENIA SAGINATA*

CÓDIGO DO ANIMAL	CISTICERCOS DESINVAGINADOS ESTUDADOS (N°)	PROTOESCÓLEX		VENTOSAS	DEPRESSÃO VENTOSIFORME
		LARGURA (µm)	COMPRIMENTO (µm)	DIÂMETRO (µm)	DIÂMETRO (µm)
01	16	845,62	893,28	305,28	246,76
04	02	781,05	836,40	312,11	107,63

Na microscopia eletrônica de varredura foi possível visualizar com detalhes as estruturas dos cisticercos desinvaginados (FIGURA 7 e 8)

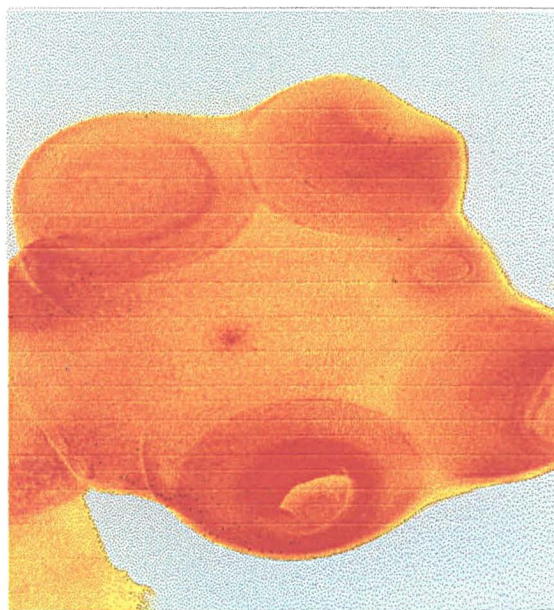


FIGURA 6 - ESCÓLEX DE *CYSTICERCUS BOVIS* OBTIDO POR FOTOMICROGRAFIA NA MICROSCOPIA ÓPTICA. AUMENTO DE 100X , CURITIBA, OUTUBRO, 1994.

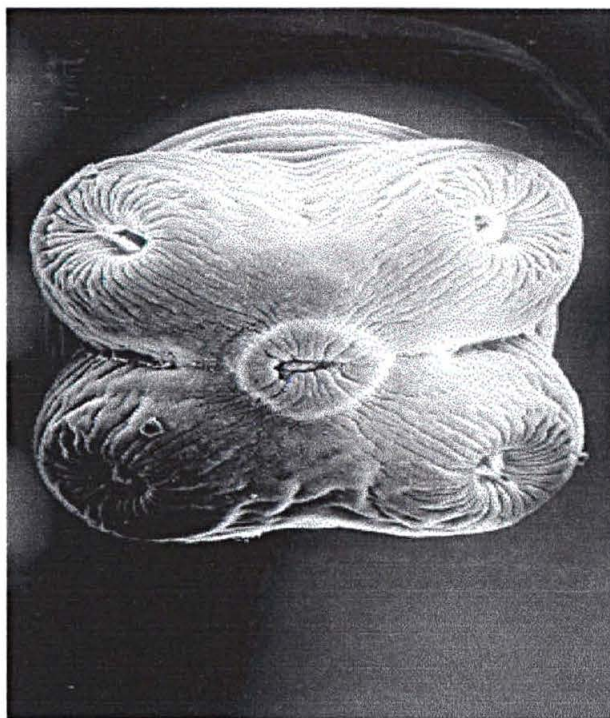


FIGURA 7 - ESCÓLEX DE *CYSTICERCUS BOVIS* OBTIDO POR FOTOMICROGRAFIA NA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA. AUMENTO DE 163X, CURITIBA, OUTUBRO, 1994.

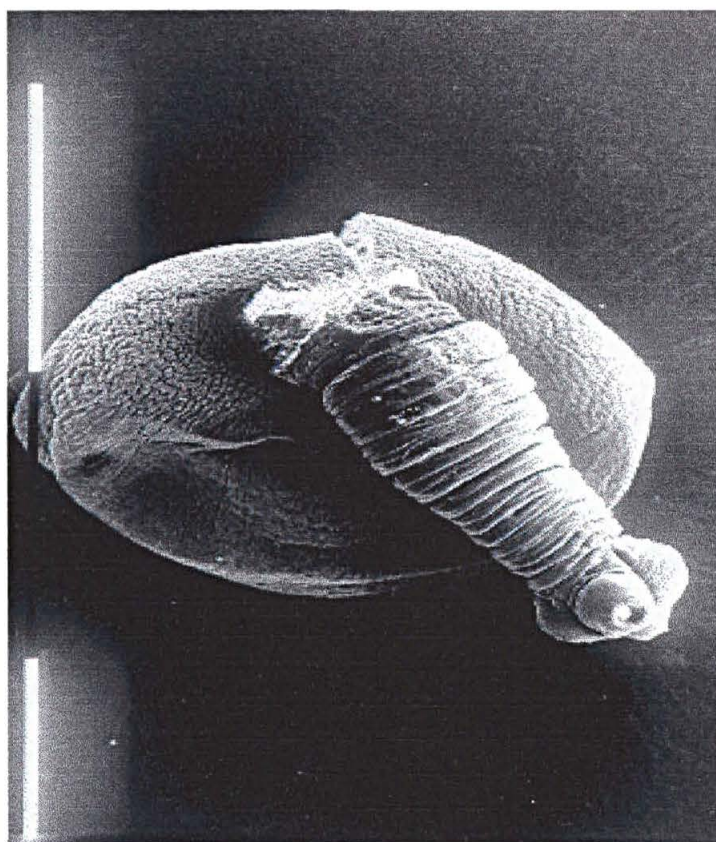


FIGURA 8 - *CYSTICERCUS BOVIS* DESINVAGINADO OBTIDO POR FOTOMICROGRAFIA NA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA. AUMENTO DE 40X, CURITIBA, OUTUBRO, 1994.

3.2. - TESTE DE ELISA

3.2.1. PADRONIZAÇÃO DO ANTÍGENO

3.2.1. 1. - ANTÍGENO DE *CYSTICERCUS CELLULOSAE*

Para padronizar a concentração proteica de antígeno de *Cysticercus cellulosae* produzido no item 2.2.2.1.1, este foi diluído em PBS 0,05 M com 0,15 M de NaCl, pH 7,4 e centrifugado a 3.000 R.P.M. por cinco minutos. A concentração proteica do antígeno foi determinada pelo método de LOWRY, 1951, conforme TABELA 5 e FIGURA 9.

TABELA 5 - DOSAGEM DE PROTEÍNAS DO ANTÍGENO EXTRATO SALINO PARCIAL DE *CYSTICERCUS CELLULOSAE*

TUBO	PADRÃO	ÁGUA DESTILADA	AMOSTRA	REAGENTE A	REAGENTE B	CONCENTRAÇÃO PROTEICA	ABSORBÂNCIA 660 nm
1	40µl	460µl	-	5 ml	0,5 ml	40µg	0,088
2	50µ	450µl	-	5 ml	0,5 ml	50µg	0,094
3	60µ	440µl	-	5 ml	0,5 ml	60µg	0,122
4	70µ	430µl	-	5 ml	0,5 ml	70µg	0,132
5	80µ	420µl	-	5 ml	0,5 ml	80µg	0,168
6	90µ	410µl	-	5 ml	0,5 ml	90µg	0,178
7	100µ	400µl	-	5 ml	0,5 ml	100µg	0,203
Branco	-	500µl	-	5 ml	0,5 ml	-	0,000
Amostra	-	400µl	100µl	5 ml	0,5 ml	-	0,085

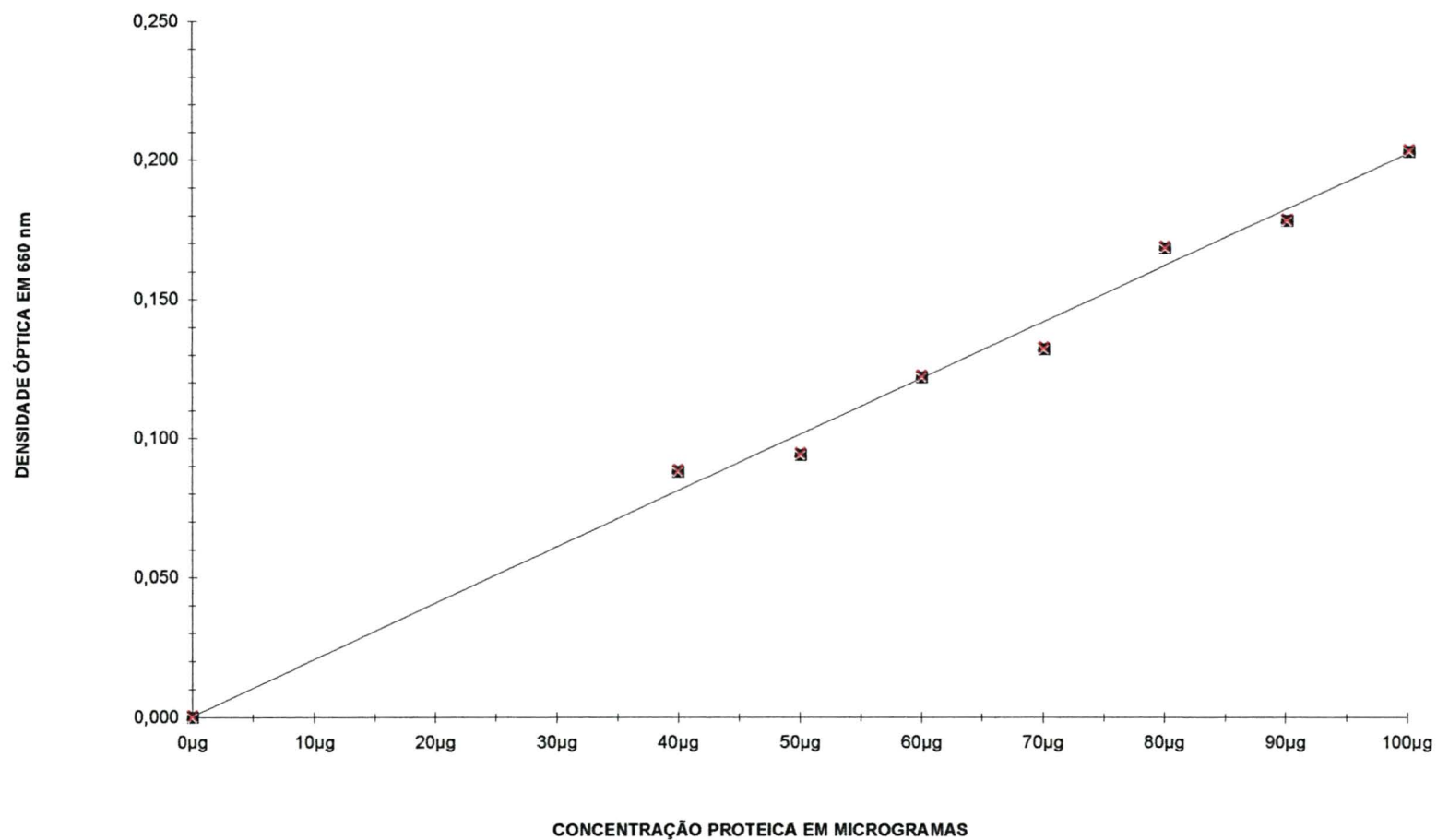


FIGURA 9 - CURVA PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

Trabalhou-se inicialmente com a concentração de 250 e 500 nanograma (ng) de proteína por “weel”. No ensaio, realizado com as duas quantidades de antígeno por “weel”, não foram observadas diferenças significativas, quando desafiadas com soro de animais positivos e negativos para cisticercose (figura 10). Por esta razão, optou-se por utilizar 250 ng de proteínas por “weel”.

3.2.1.2. - ANTÍGENO DE *CYSTICERCUS BOVIS*

Os testes iniciais com extrato salino total de *Cysticercus bovis*, seguiram os mesmos padrões de concentração de proteínas de antígeno por “weel” dos testes realizados com o antígeno de *Cysticercus cellulosae* ou seja, de 250 ng. Verificando-se boa reatividade nesta concentração de antígeno por “weel” manteve-se a mesma até o final do ensaio. A concentração proteica do antígeno produzido foi de 0,39 mg por ml.

3.2.1.3. - ANTÍGENO DE *CYSTICERCUS LONGICOLLIS*

Trabalhou-se inicialmente com 250 ng por “weel”. Observou-se que nesta quantidade de antígeno os valores de absorbância eram extremamente baixos. Aumentando-se para 1.000 ng por “weel”, verificou-se ligeiro aumento de absorbância porém, ainda muito baixo. Optou-se por utilizar, por “weel” o correspondendo a 3,0 µg por “weel”.

DILUIÇÃO DO CONJUGADO 1:400

DILUIÇÃO DOS SOROS 1:200

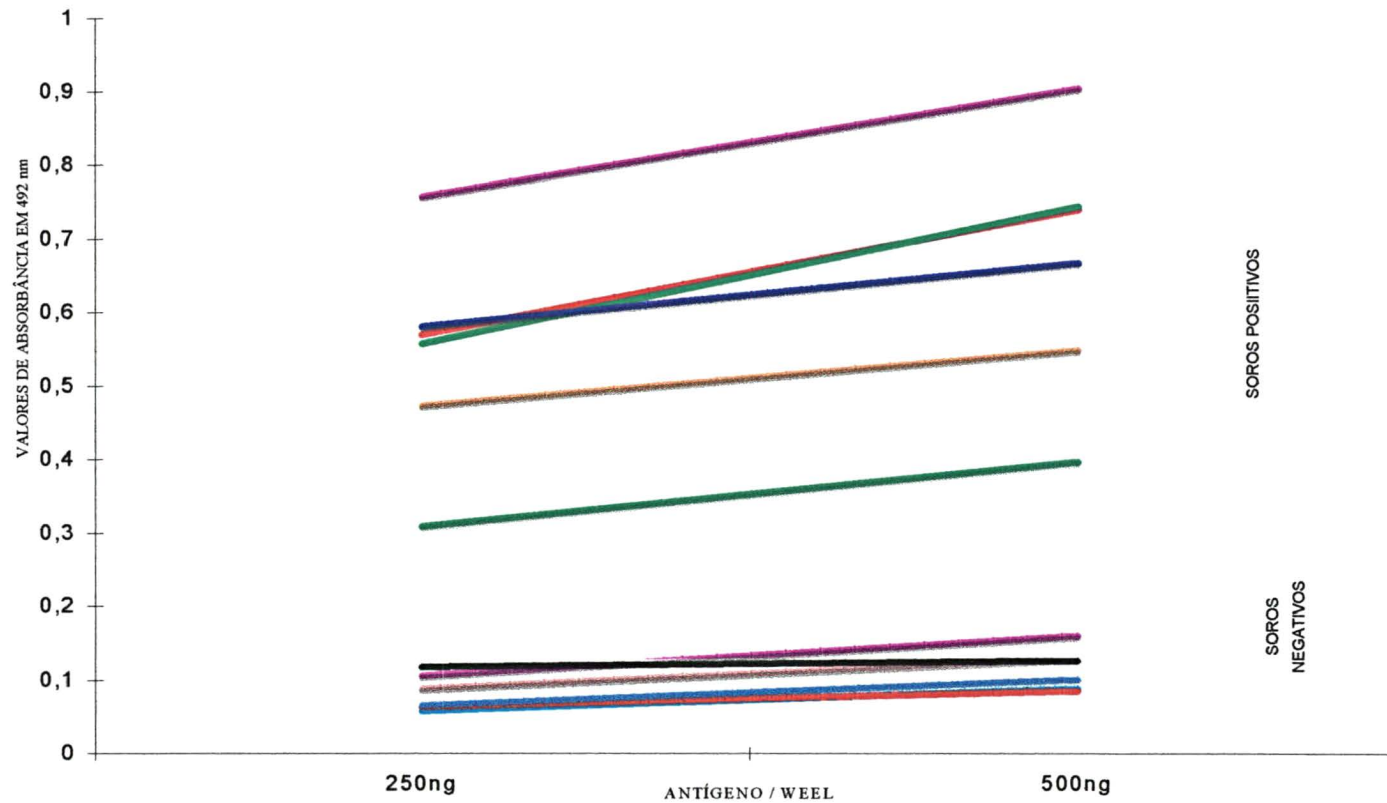


FIGURA 10 - VALORES DE ABSORBÂNCIA DOS SOROS DE BOVINOS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA CISTICERCOSE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ANTÍGENO / WEEL.

3.2.2. - DILUIÇÃO DOS SOROS

Os primeiros ensaios do teste ELISA foram realizados diluindo-se os soros em 50 vezes. Nesta diluição verificou-se valores de absorbância elevados. Partiu-se a seguir para diluições de 100, 200, 400 vezes. Verificou-se nas diluições 200 e 400 vezes diminuição acentuada dos valores de absorbância dos bovinos portadores de cisticercose, com tendência de aproximação de valores de animais não portadores de cisticercose (FIGURAS 11 E 12). Por esta razão, foi feita opção pela diluição de 100 vezes.

3.2.3. - DILUIÇÃO DO CONJUGADO

Foram feitos testes com soros de animais portadores de cisticercose e animais livres da doença nas diluições de 50 a 400 vezes. As placas foram sensibilizadas com 250ng de proteína antigênica por "weel". O conjugado foi diluído em 400 e 800 vezes. Verificou-se melhor discriminação entre animais cisticercóticos e não cisticercóticos na diluição do conjugado de 400 vezes. Na diluição de 800 vezes os valores de absorbância foram menores em relação a diluição de 400 vezes (FIGURAS 11 E 12). Fez-se então a escolha da diluição do conjugado em 400 vezes.

3.2.4. - CUT-OFF

Depois de testados a reatividade do antígeno, o extrato salino parcial de *Cysticercus cellulosae*, bem como o conjugado e todos os demais reagentes envolvidos na prova, deu-se início aos ensaios para estabelecer o "cut-off".

Trabalhou-se com extrato salino parcial de *Cysticercus cellulosae* na concentração de 250ng de proteína por “weel”. As amostras de soros bovinos foram diluídas em 100 vezes. O conjugado Goot anti IgG Bovino foi diluído 400 vezes.

3.2.4.1. - AMOSTRAS DE SOROS

Para determinar o valor do “cut-off” foi necessário desenvolver o teste de ELISA com amostras de soro de bovinos não portadores de cisticercose. A certeza de que um bovino não seja portador de cisticercos só é possível se o animal for criado em área livre de *Taenia saginata* ou então se o animal for abatido e posteriormente feita minuciosa inspeção com o fatiamento total de todos os músculos e órgãos. É desconhecida a existência de áreas livres de cisticercose bovina no Brasil. A segunda opção era extremamente dispendiosa quanto a recursos financeiros e humanos. Como alternativa colheu-se amostras de soros de Bovinos de duas fazendas com boas condições higiênicas, sanitárias e zootécnicas. Na primeira propriedade, denominada “fazenda paraíso”, localizada no município de Balsa Nova - Pr. Nesta colheu-se 70 amostras de soro de bovinos machos e fêmeas. Na outra propriedade, localizada no município de Palmeiras, “fazenda serrana, colheu-se 29 amostras de machos e fêmeas. A idade dos 99 animais amostrados variou entre 2 a 15 meses. Os valores de absorbância variaram de 0,008 a 0,356, sendo que 62,63% ficaram abaixo de 0,100. Os resultados da absorbância obtidos estão relacionados na TABELA 6.

DILUIÇÃO DO CONJUGADO 1:800

CONCENTRAÇÃO DO ANTÍGENO 250ng/Weel

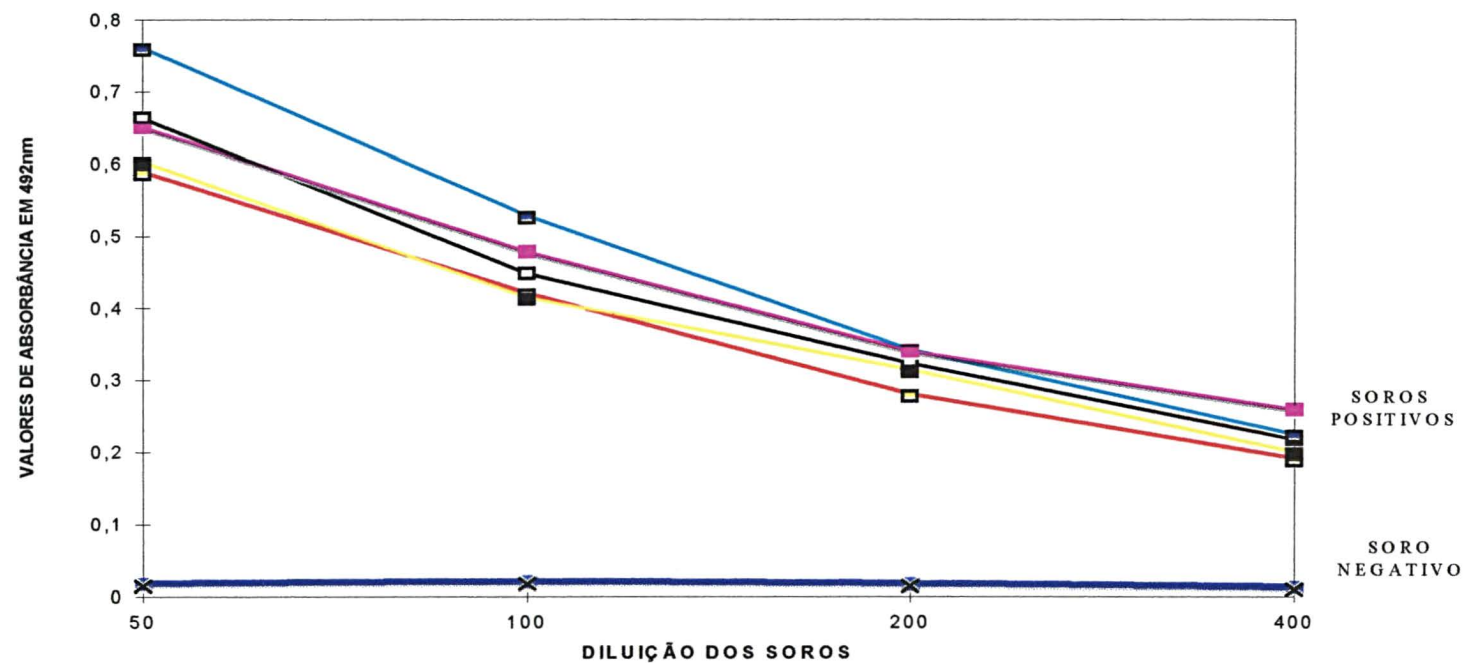


FIGURA 11 - TITULAÇÃO DE CONJUGADO 1:800 DE IgG DE CABRA ANTI-IgG BOVINA-PEROXIDASE COM DIFERENTES DILUIÇÕES DOS SOROS DE BOVINOS POSITIVOS E NEGATIVO PARA CISTICERCOSE.

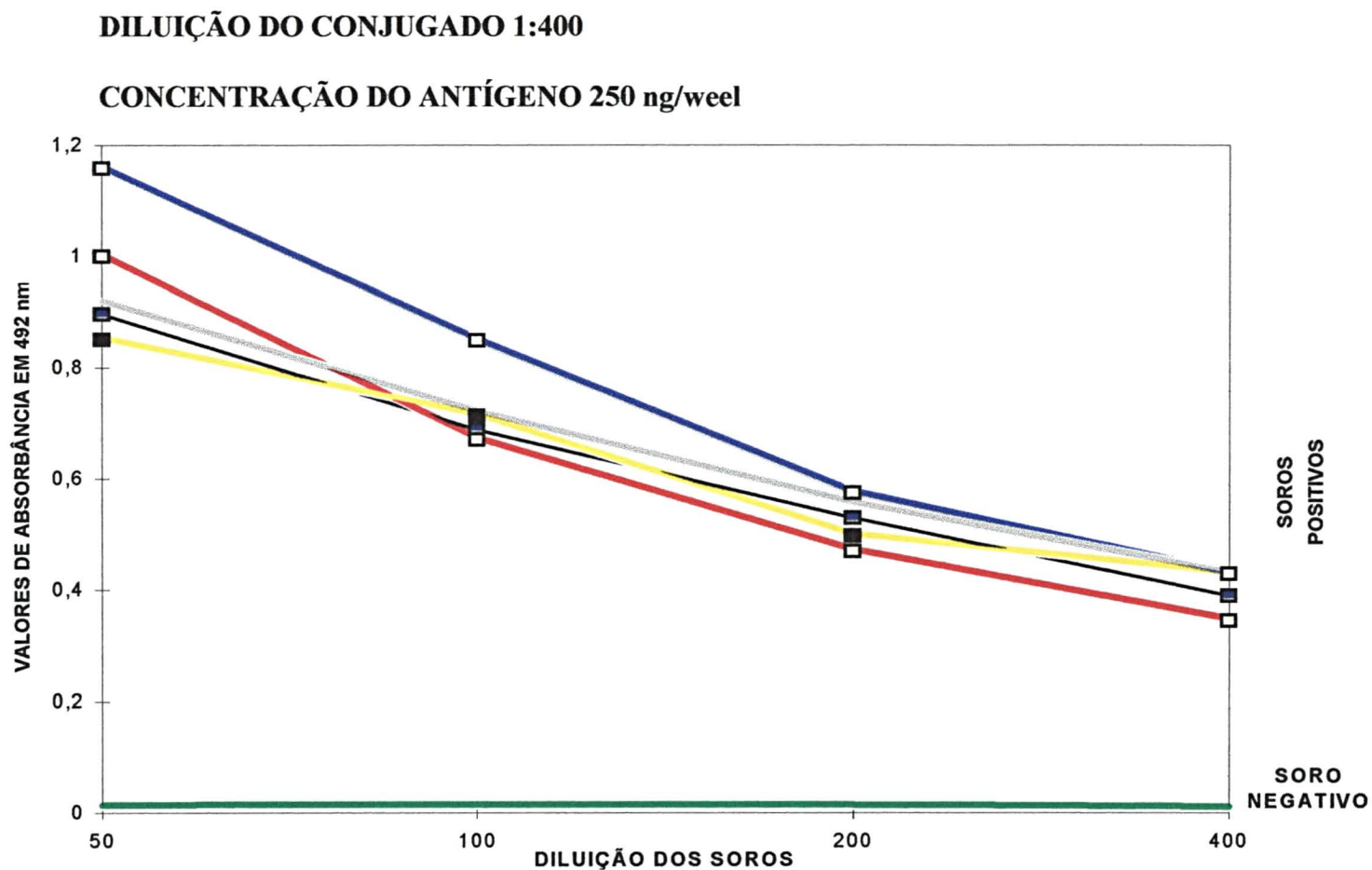


FIGURA 12 - TITULAÇÃO DE CONJUGADO 1:400 DE IgG DE CABRA ANTI-IgG BOVINA-PEROXIDASE COM DIFERENTES DILUIÇÕES DOS SOROS DE BOVINOS POSITIVOS E NEGATIVO PARA CISTICERCOSE.

TABELA 6 - VALORES DE ABSORBÂNCIA DE AMOSTRAS DE SOROS DE BOVINOS NÃO INFECTADOS COM CISTICERCOS DE *TAENIA SAGINATA*.

AMOSTRA	ABSORBÂNCIA	AMOSTRA	ABSORBÂNCIA	AMOSTRA	ABSORBÂNCIA
60	0,0080	4	0,0445	68	0,0930
57	0,0125	7	0,0445	5	0,0985
61	0,0155	36	0,0470	2	0,1005
75	0,0165	69	0,0480	31	0,1005
77	0,0180	78	0,0485	53	0,1015
18	0,0185	33	0,0490	87	0,1050
26	0,0190	46	0,0500	32	0,1055
15	0,0200	64	0,0525	11	0,1080
17	0,0200	79	0,0530	67	0,1130
71	0,0205	24	0,0540	73	0,1135
54	0,0210	28	0,0550	50	0,1175
62	0,0220	1	0,0565	82	0,1215
19	0,0240	9	0,0585	44	0,1335
25	0,0240	35	0,0585	85	0,1340
74	0,0250	6	0,0640	40	0,1410
63	0,0260	70	0,0750	66	0,1445
72	0,0280	29	0,0754	8	0,1470
38	0,0285	30	0,0755	43	0,1760
81	0,0285	3	0,0760	14	0,1970
76	0,0295	65	0,0770	83	0,1980
16	0,0300	48	0,0820	10	0,2165
51	0,0305	12	0,0825	88	0,2210
59	0,0325	13	0,0840	89	0,2230
80	0,0345	56	0,0840	37	0,2355
42	0,0350	48	0,0850	84	0,2475
52	0,0360	55	0,0855	86	0,2680
20	0,0410	30	0,0870	41	0,2985
58	0,0425	47	0,0880	34	0,3235
22	0,0430	23	0,0885	21	0,3560
45	0,0430	27	0,0915	-	-

“CUT-OFF”= MÉDIA ARITMÉTICA + 3 x DESVIO PADRÃO
--

$$\text{MÉDIA} = 0,087$$

$$\text{DESVIO PADRÃO} = 0,074$$

$$\text{“CUT-OFF”} = 0,087 + 3 \times 0,074$$

$$\text{“CUT-OFF”} = 0,310$$

Para os nossos padrões ficou estabelecido que o “cut-off” será de 0,310.

Portanto, os dois últimos animais encontravam-se dentro do limiar de positividade.

3.2.5. - TESTE DE ELISA DOS BOVINOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS

3.2.5.1.- TESTE DE ELISA COM ANTÍGENO EXTRATO SALINO PARCIAL DE *CYSTICERCUS CELLULOSAE*

Seguindo-se as mesmas condições desenvolvidas para estabelecer o “cut-off”, foram analisadas 16 amostras de cada bovino (I a XVI). Sendo a primeira 97 dias antes da infecção experimental; a segunda no dia da infecção com ovos de *Taenia saginata*. Após esta data colheu-se semanalmente 14 amostras.

Todos os animais apresentaram um aumento da taxa de anticorpos à partir da 8ª sangria ou seja a partir de 36 dias depois da infecção (TABELA 7). Todavia, no animal N° 1 observou-se que o início do aumento de anticorpos foi a partir de 27 dias depois da infecção (FIGURA 13). O pico de anticorpos manteve-se por 4 semanas.

TABELA 7 - VALORES DE ABSORBÂNCIA OBSERVADOS NO TESTE DE ELISA DOS BEZERROS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM OVOS DE *TAENIA SAGINATA*, UTILIZANDO ANTÍGENO EXTRATO SALINO PARCIAL DE *CYSTICERCUS CELLULOSAE*

CÓDIGO DO ANIMAL	OVOS POR ANIMAL	AMOSTRAS CORRESPONDENTES AOS DIAS DE INFECÇÃO															
		-97 (I)	0 (II)	8 (III)	12 (IV)	19 (V)	27 (VI)	34 (VII)	36 (VIII)	41 (IX)	48 (X)	55 (XI)	62 (XII)	69 (XIII)	75 (XIV)	82 (XV)	89 (XVI)
1	20000	0,045	0,067	0,085	0,156	0,123	0,265	0,448	0,586	0,717	0,591	0,458	0,549	0,535	0,421	0,336	0,271
3	20000	0,051	0,244	0,296	0,338	0,396	0,317	0,303	0,306	0,604	0,781	0,760	0,743	0,416	0,335	0,402	0,349
4	20000	0,049	0,133	0,239	0,256	0,234	0,207	0,223	0,231	0,436	0,586	0,648	0,185	0,105	0,327	0,476	0,433
9	20000	0,099	0,154	0,220	0,249	0,258	0,179	0,196	0,301	0,394	0,325	0,284	0,375	0,151	0,126	0,145	0,150
6	0	0,042	0,144	0,179	0,151	0,164	0,148	0,226	0,108	0,239	0,178	0,213	0,241	0,162	0,158	0,202	0,172

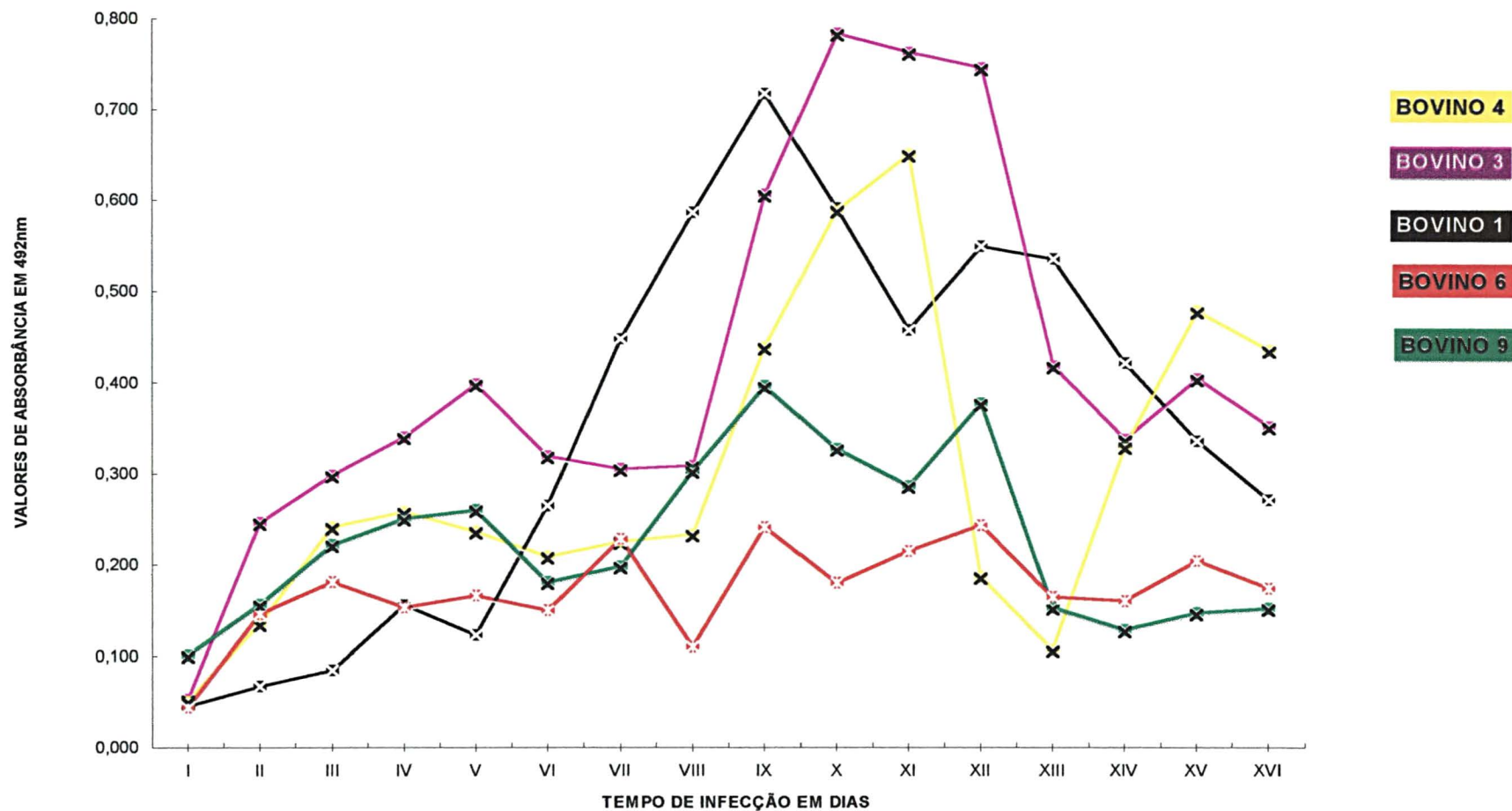


FIGURA 13 - VALORES DE ABSORBÂNCIA OBSERVADOS NO TESTE DE ELISA DOS BEZERROS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM OVOS DE *TAENIA SAGINATA*, UTILIZANDO ANTÍGENO EXTRATO SALINO PARCIAL DE *CYSTICERCUS CELLULOSAE*

3.2.5.2. - TESTE DE ELISA COM ANTÍGENO EXTRATO SALINO TOTAL DE *CYSTICERCUS BOVIS*

As amostras de soro dos bovinos, experimentalmente infectados com ovos de *Taenia saginata* foram testadas utilizando o antígeno extrato salino total de *Cysticercus bovis*, produzido de forma semelhante ao antígeno extrato salino parcial de *Cysticercus cellulosae*.

Com a utilização de *Cysticercus bovis* como antígeno observa-se resultados parecidos com os do teste realizado com antígeno de *Cysticercus cellulosae*. Isto é, a partir da 8ª sangria três animais tiveram aumento da taxa de anticorpos (TABELA 8). O ápice de reação dos quatro animais infectados foi entre 41 e 55 dias depois da infecção. Em todos os animais a taxa de anticorpos inicia sua queda a partir de 62 e 69 dias após a infecção (FIGURA 14). O animal Nº 4 tem início de segundo pico de anticorpos a partir da 14ª sangria.

TABELA 8 - VALORES DE ABSORBÂNCIA OBSERVADOS NO TESTE DE ELISA DOS BEZERROS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM OVOS DE *TAENIA SAGINATA*, UTILIZANDO ANTÍGENO EXTRATO SALINO TOTAL DE *CYSTICERCUS BOVIS*

CÓDIGO DO ANIMAL	OVOS POR ANIMAL	AMOSTRAS CORRESPONDENTES AOS DIAS DE INFECÇÃO															
		-97 (I)	0 (II)	8 (III)	12 (IV)	19 (V)	27 (VI)	34 (VII)	36 (VIII)	41 (IX)	48 (X)	55 (XI)	62 (XII)	69 (XIII)	75 (XIV)	82 (XV)	89 (XVI)
1	2000	0,042	0,028	0,054	0,033	0,064	0,074	0,194	0,166	0,219	0,217	0,199	0,167	0,151	0,141	0,128	0,105
3	2000	0,029	0,045	0,057	0,049	0,059	0,077	0,085	0,095	0,193	0,352	0,503	0,398	0,198	0,212	0,192	0,219
4	2000	0,028	0,060	0,028	0,038	0,035	0,038	0,049	0,055	0,074	0,145	0,175	0,050	0,053	0,132	0,228	0,245
9	2000	0,057	0,078	0,084	0,103	0,093	0,119	0,114	0,117	0,163	0,226	0,141	0,187	0,080	0,087	0,128	0,122
6	2000	0,019	0,041	0,064	0,031	0,048	0,029	0,028	0,027	0,040	0,067	0,052	0,045	0,036	0,051	0,036	0,054

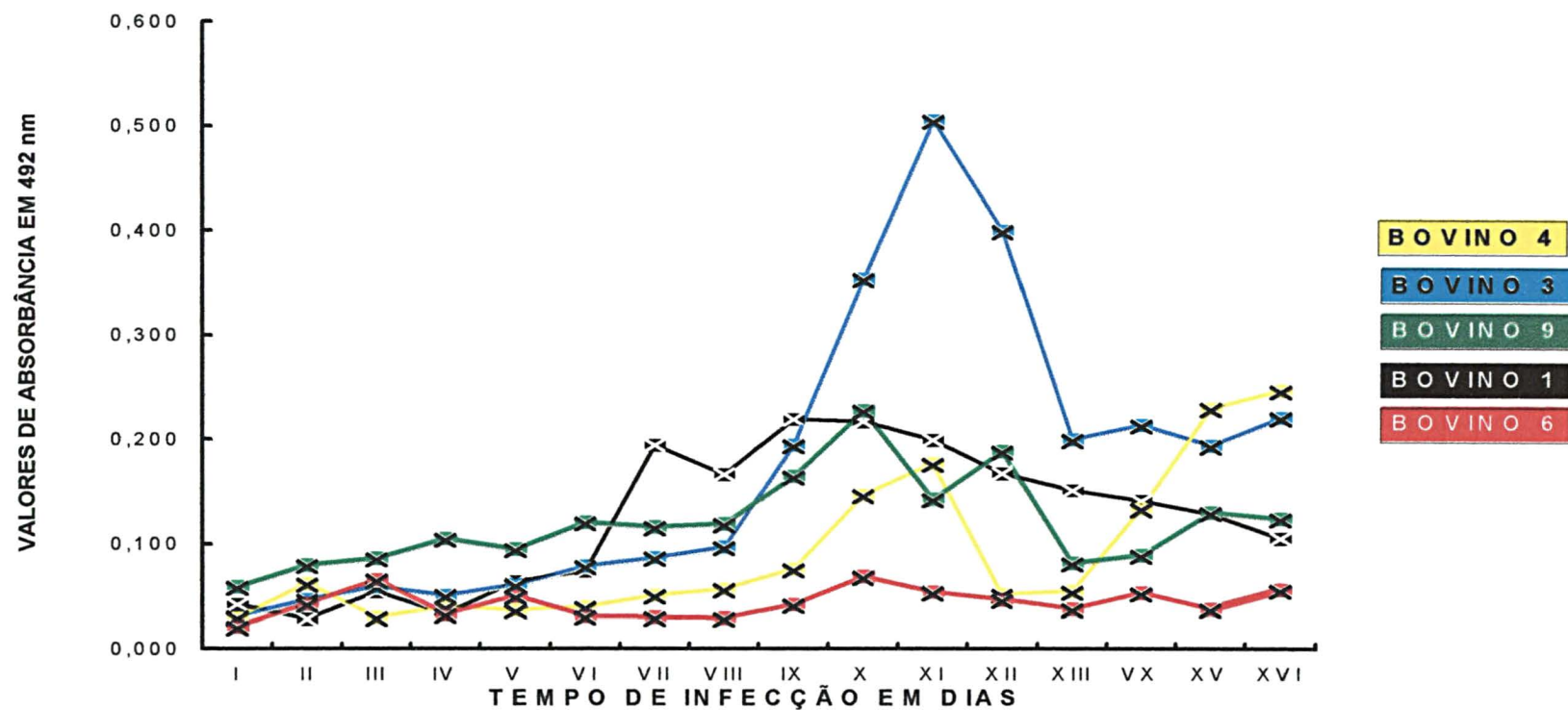


FIGURA 14 - VALORES DE ABSORBÂNCIA OBSERVADOS NO TESTE DE ELISA DOS BEZERROS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM OVOS DE *TAENIA SAGINATA*, UTILIZANDO ANTÍGENO EXTRATO SALINO TOTAL DE *CYSTICERCUS BOVIS*

3.2.5.3. - TESTE DE ELISA COM ANTÍGENO TOTAL DE *CYSTICERCUS*

LONGICOLLIS

A prova de ELISA empregando antígeno total de *Cysticercus longicollis* na concentração de 250 ng/weel apresentaram valores de absorbância acentuadamente baixos compreendendo aos extremos de 0,006 a 0,85. Os valores absolutos dos animais infectados e não infectados foram baixos. Aumentando-se a concentração de antígeno para 1000 ng/weel a absorbância teve aumento proporcional mas ainda baixo. Aumentando-se a quantidade de antígeno para 3000 ng/weel verificou-se valores de absorbância proporcionalmente maiores do que a concentração anterior com variações entre os extremos de 0,010 a 0,154. Nos testes do animal branco a absorbância máxima foi de 0,052. Por sua vez animais cisticercóticos em determinados períodos apresentaram valores de absorbância superiores a 0,088 (TABELA 9 E FIGURA 15).

Comparando-se a reatividade dos três antígenos trabalhados frente aos soros positivos para cisticercose, observou-se acentuada correlação dos picos de absorbância. Em relação a intensidade de reação verificou-se ser em ordem decrescente de extrato salino parcial de *Cysticercus cellulose*, extrato salino total de *Cysticercus bovis*, antígeno total de *Cysticercus longicollis* (FIGURA 16).

TABELA 9 - VALORES DE ABSORBÂNCIA OBSERVADOS NO TESTE ELISA DOS BEZERROS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM OVOS DE *TAENIA SAGINATA*, UTILIZANDO ANTÍGENO TOTAL DE *CYSTICERCUS LONGICOLLIS*.

CÓDIGO DO ANIMAL	OVOS POR ANIMAL	AMOSTRAS CORRESPONDENTES AOS DIAS DE INFECÇÃO															
		-97 (I)	0 (II)	8 (III)	12 (IV)	19 (V)	27 (VI)	34 (VII)	36 (VIII)	41 (IX)	48 (X)	55 (XI)	62 (XII)	69 (XIII)	75 (XIV)	82 (XV)	89 (XVI)
1	20000	0,014	0,012	0,025	0,012	0,029	0,034	0,087	0,066	0,081	0,088	0,069	0,061	0,064	0,068	0,075	0,061
3	20000	0,021	0,023	0,028	0,029	0,042	0,040	0,047	0,049	0,082	0,154	0,141	0,151	0,074	0,094	0,070	0,093
4	20000	0,016	0,025	0,030	0,021	0,030	0,026	0,043	0,042	0,033	0,064	0,075	0,024	0,027	0,038	0,094	0,110
6	20000	0,010	0,022	0,030	0,025	0,034	0,023	0,038	0,031	0,031	0,028	0,032	0,035	0,040	0,020	0,024	0,052
9	20000	0,047	0,050	0,069	0,066	0,074	0,073	0,080	0,061	0,086	0,103	0,082	0,085	0,053	0,072	0,099	0,064

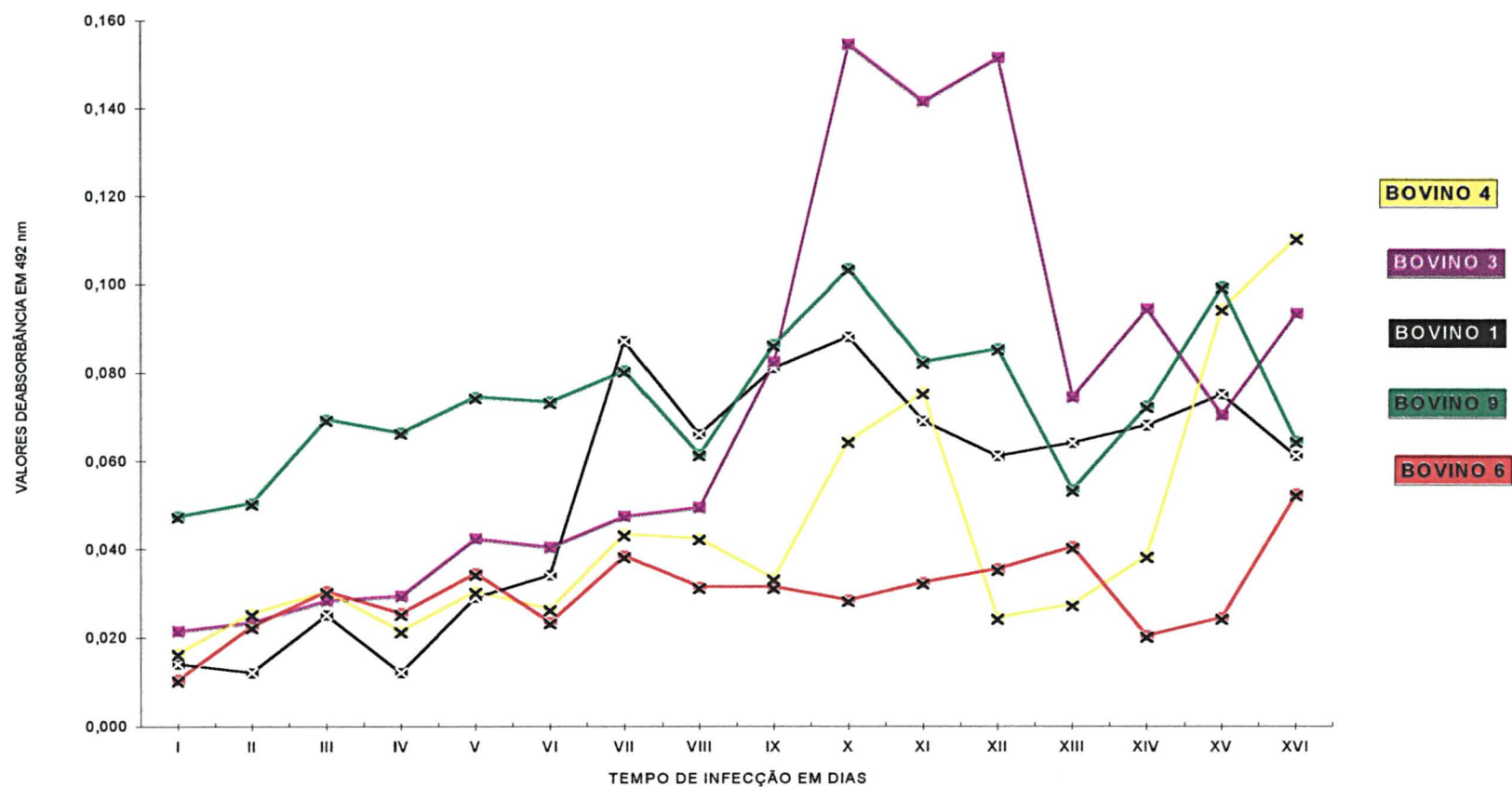


FIGURA 15 - VALORES DE ABSORBÂNCIA OBSERVADOS NO TESTE DE ELISA DOS BEZERROS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM OVOS DE *TAENIA SAGINATA*, UTILIZANDO ANTÍGENO TOTAL DE *CYSTICERCUS LONGICOLLIS*.

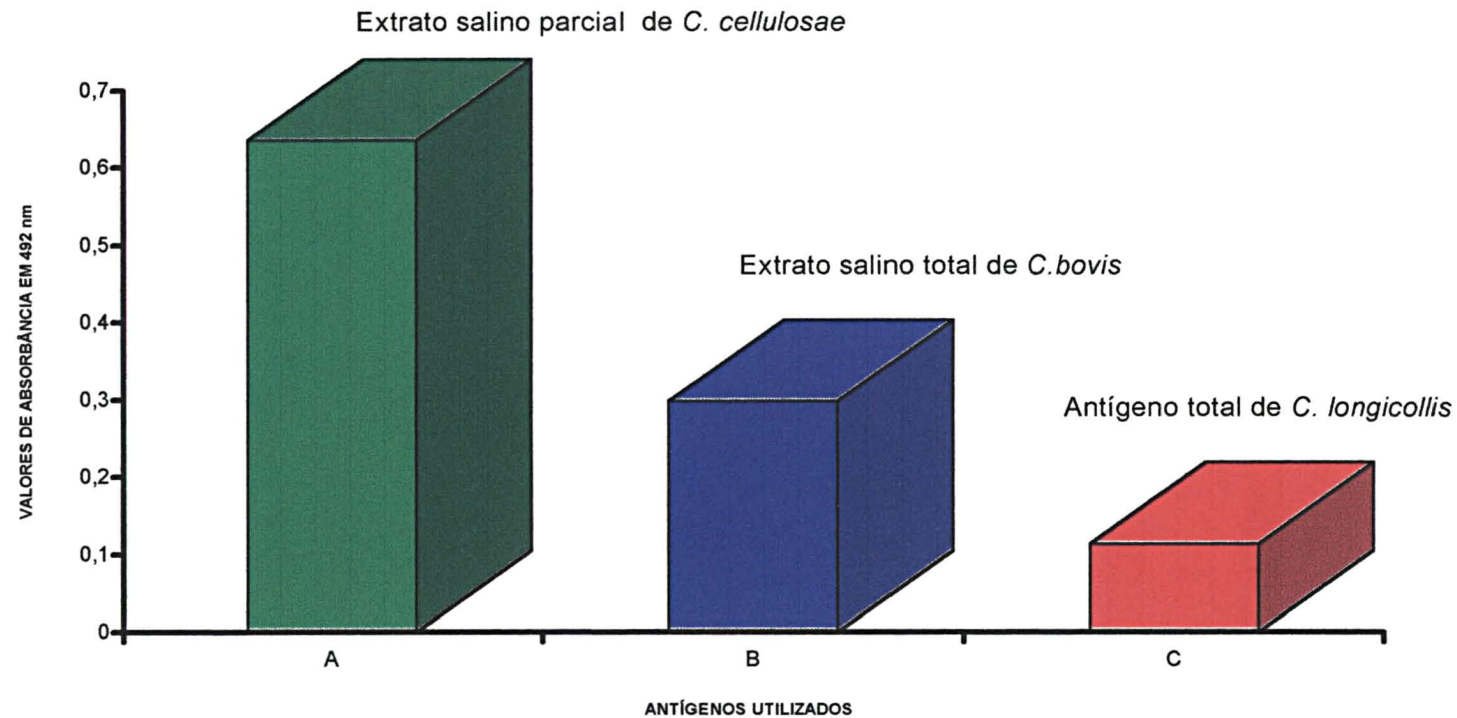


FIGURA 16 - MÉDIA DOS PICOS DE ABSORBÂNCIA, DE SOROS DOS 4 BOVINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM OVOS DE *TAENIA SAGINATA*, FRENTE AOS DIFERENTES ANTÍGENOS.

3.2.6. - APLICABILIDADE DO TESTE DE ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-CYSTICERCUS BOVIS EM BOVINOS CONSIDERADOS NEGATIVOS NA INSPEÇÃO MACROSCÓPICA

Para testar a técnica de ELISA desenvolvida tendo como antígeno extrato salino total de *Cysticercus cellulosae*, sendo estabelecido o “cut-off” como absorbância de 0,310, foram colhidos em frigorífico 20 amostras de soro de bovinos, os quais em inspeção normal foram considerados não portadores de cisticercose. Dentre os 20 animais examinados sorologicamente, 02 (10%) apresentaram valores de absorbância acima do “cut-off” indicando presença de cisticercos (TABELA 10).

TABELA 10 - VALORES DE ABSORBÂNCIA DOS SOROS DE BOVINOS, ORIUNDOS DE ABATE NORMAL EM FRIGORÍFICO, LIBERADOS COMO NÃO PORTADORES DE CISTICERCOS.

AMOSTRA	ABSORBÂNCIA	AMOSTRA	ABSORBÂNCIA	AMOSTRA	ABSORBÂNCIA
01	0,051	08	0,089	15	0,130
02	0,057	09	0,094	16	0,132
03	0,069	10	0,099	17	0,140
04	0,077	11	0,108	18	0,164
05	0,077	12	0,112	19	0,323
06	0,082	13	0,113	20	0,442
07	0,086	14	0,124	-	-

4. - DISCUSSÃO

Neste trabalho foi realizada infecção experimental de bovinos com ovos de *Taenia saginata*. No total quatro animais foram desafiados com 2×10^4 ovos de *Taenia saginata*. Depois do período de desenvolvimento dos cisticercos (90 a 111 dias) os animais foram sacrificados. Em todos os animais fez-se rigorosa inspeção a procura de cisticercos. Para isso foi feito fatiamento, com intervalo de até cinco mm entre cortes, de órgãos e da musculatura esquelética. Os cisticercos encontrados foram avaliados quanto ao estágio biológico em que se encontravam.

Dos cinco bovinos, do experimento, colheu-se amostra de sangue 97 dias antes, no momento e depois da infecção, semanalmente até o abate. Com o soro dos mesmos foi pesquisado a formação de anticorpos anti-*Cysticercus bovis*. Neste ensaio biológico foram testadas três preparações antigênicas: extrato salino parcial de *Cysticercus cellulosae*, extrato salino total de *Cysticercus bovis*, antígeno total de *Cysticercus longicollis*. Os dois primeiros foram produzidos durante o experimento e o último foi produzido no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo -SP.

Dos quatro animais experimentalmente infectados foram recuperados 702 cisticercos, destes 570 (81,20%) eram vivos e 132 (18,80%) degenerados. A taxa de recuperação, em relação ao número de ovos ingeridos, foi em média de 0,88%. Considerando-se os locais normalmente examinados, pelos serviços de inspeção, para presença de cisticercos, verificou-se: na língua 7 (1,00%), no diafragma 18 (2,56%), nos músculos da mastigação 25 (3,56%), no coração 49 (6,98%), totalizando 99 (14,10%). Os 85,90% dos cistos restantes estavam localizados na musculatura esquelética e em outros órgãos onde não é feito exame

de rotina. Destes, 02 (0,28%) estavam nos músculos hióideos, 03 (0,43%) rins, 12 (1,71%) fígado, 15 (2,14%) pulmões, 323 (46,00%) músculos dianteiros, 248 (35,33%) músculos traseiros. Estes percentuais vem de encontro aos achados por FAN et al., 1992, no qual foram recuperados 303 cisticercos (3%), de 10.000 ovos inoculados. Estes autores assinalam que dos cistos recuperados, 15,66% estavam nos locais normalmente pesquisados para cisticercose e 84,34% no restante da musculatura esquelética. Em trabalho anterior, FAN et al., (1988) observaram, em infecção experimental de bezerro, com quatro meses de idade, 16,67% dos cisticercos no coração e 83,33% na musculatura esquelética. Por sua vez, WALTER e KOSKE, (1980) verificaram que de 60 bovinos portadores de cisticercos apenas 23 (38,30%) foram detectados pela inspeção normal e o restante 37 (61,70%) só foram detectados por fatiamento.

É importante ressaltar que no processo de inspeção habitual, os locais de eleição, para pesquisa de cisticercos são explorados parcialmente. Isto é, apenas alguns cortes são realizados. A pesquisa exaustiva nestes tecidos ou em tecidos nobres, resulta em grandes perdas econômicas. Como estes tecidos só são parcialmente fatiados e se for considerado que próximo de 50% dos tecidos inspecionados são seccionados, matematicamente apenas 7,05% dos cisticercos seriam detectados. Poder-se-ia dizer que para cada 01 cisticerco encontrado nestes tecidos outros 6,10 encontram-se distribuídos pelo restante da musculatura e órgãos, não sendo portanto, detectados. Além disso, alguns cistos podem estar distribuídos pela carcaça sem que os tecidos habitualmente inspecionados estejam parasitados. Com esta relação ficam evidentes as limitações da inspeção para a cisticercose bovina, principalmente em carcaças infectadas por poucos cisticercos.

Neste sentido, SANTOS em 1993, verificou que de 4.366 bovinos parasitados, 96,70% (4.222) eram monocisticercóticos.

Segundo nossos dados 14,10% dos cisticercos encontram-se nos locais normalmente examinados, por mais eficientes que sejam os profissionais da inspeção, parece estar distante os resultados da inspeção normal para que esta influencie fortemente a interrupção do ciclo da doença. Para que o ciclo do parasita possa ser interrompido é necessário melhorar acentuadamente a eficiência da inspeção. Isto poderá ser alcançado ampliando-se os locais de pesquisa, com a inclusão do exame em outros músculos menos nobres, aumentando-se o número e a profundidade das incisões. Além disso, é importante que profissionais que façam inspeção estejam conscientes da importância de identificar e dar tratamento adequado às carcaças portadoras de cisticercos, evitando-se assim o desenvolvimento de novas tênias.

Os dados obtidos mostram que uma percentagem importante de carcaças infectadas, com cisticercos, podem passar despercebidas. Segundo nossos dados 85,90% dos cisticercos encontrados por fatiamento não seriam detectados na inspeção normal. Para que fossem encontrados seria necessário o fatiamento de todos os órgãos e de toda a musculatura esquelética com intervalo de no máximo cinco milímetros. Assim sendo, os dados estatísticos dos serviços de inspeção são insuficientes para estimar a incidência de cisticercose bovina.

Os cistos caseosos ou calcificados encontrados nos bovinos não são obrigatoriamente *Cysticercus bovis*, especialmente quando são pequenos. No presente trabalho, no entanto, como se tratava de infecção experimental todos os cistos encontrados foram considerados e computados como sendo cisticercos da

Taenia saginata. Em dois animais do experimento identificou-se apenas cistos degenerados e em um deles somente dois (02) cisticercos foram encontrados. Este animal, com apenas dois cisticercos, entretanto, apresentou aproximadamente 300 manchas de migração verminótica pela superfície e parênquima do fígado. No momento da infecção, este bovino apresentava 19 meses de idade. Verificou-se que o animal adulto é mais resistente a dose desafio, sendo encontrado apenas dois cisticercos calcificados. A idade, do bovino, no momento da infecção, parece ser importante para impedir o desenvolvimento de cisticercos (SOULSBY, 1963).

Neste trabalho testou-se a técnica de ELISA indireta para diagnosticar bovinos com cisticercose. Inicialmente trabalhou-se com antígeno extrato salino parcial de *Cysticercus cellulosae*. Com este antígeno foi estabelecido os parâmetros gerais do teste, determinou-se o “cut-off”, estudou-se o comportamento imunológico dos bovinos experimentalmente infectados, testou-se amostras de soros de bovinos considerados negativos para cisticercose na inspeção normal. O antígeno extrato salino total de *Cysticercus bovis* e antígeno total de *Cysticercus longicollis* foram analisados, seguindo-se os mesmos parâmetros para aqueles de *Cysticercus cellulosae*. Todavia, só foram analisados os soros de bovinos experimentalmente infectados.

Na padronização do teste de ELISA, uma concentração de antígeno, extrato parcial de *Cysticercus cellulosae*, igual a 250 ng/pocinho foi considerada ótima. O conjugado foi utilizado na diluição de 1:400. Nesta diluição não houve reações inespecíficas com soros negativos e no controle do conjugado. Este controle foi composto de antígeno, conjugado e substrato. Os soros foram diluídos 1:100, o que corresponde ao ponto médio dos valores de absorbância da curva

(FIGURA 10). A concentração de antígeno utilizada é superior a aquelas utilizadas por KYVSGAARD et al., (1991), que utilizaram a concentração de 100 ng/pocinho. Todavia, estes autores utilizaram antígeno extraído da superfície do cisticerco da *Taenia saginata*.

Trabalhando-se com extrato salino parcial de *Cysticercus cellulosae*, verificou-se, através da prova de ELISA, que depois da infecção com ovos de *Taenia saginata*, ocorreu o desenvolvimento de anticorpos. Estes atingiram um ápice e em seguida decaíram lentamente, alcançando valores de absorbância próximo ou até abaixo do cut-off. Em dois animais do experimento, observou-se o início de um segundo pico de anticorpos 75 dias depois da infecção. Este recrudesimento de anticorpos não atingiu os valores observados no primeiro pico. No presente trabalho, a mudança progressiva dos valores de IgG em bezerros infectados com ovos de *Taenia saginata*, coincide com os achados de HARRISON e SEWELL, (1981); KAMANGA-SOLLO et al., (1987); KYVSGAARD et al., (1991); SMITH et al., (1991). Por sua vez, BRANDT et al., (1992) detectou anticorpos na sexta semana após infecção. Porém, o nível foi crescente até 20 semanas, quando estes autores realizaram o abate dos animais.

Valores de absorbância mais altos foram verificados em bovinos com maior número de cisticercos. Todavia, estas diferenças não foram expressivas e, tão pouco, diretamente proporcionais ao número de cisticercos recuperados. No bovino portador de apenas 02 cisticercos calcificados, foi observado valor de absorbância de média intensidade, no período de 36 a 62 dias após a infecção. Porém, com valores mais baixos se comparados com aqueles obtidos nos bovinos portadores de maior número de cisticercos. Neste sentido, a principal dificuldade,

com relação a sorologia para cisticercose bovina, são os baixos níveis de anticorpos em animais com infecções leves (HAYUNG et al., 1991_a; KYVSGAARD et al., 1991; SMITH et al., 1991). Estudos realizados por vários autores revelaram diferentes limiares de sensibilidade. Para HAYUNG et al., (1991) reação falsa-negativa foi verificada em bovinos com 83 cisticercos. Porém, posteriormente, o mesmo autor (HAYUNG et al., 1991)_b encontrou o limiar de positividade de 12 cisticercos. Para KYVSGAARD et al., (1991), o limiar de positividade foi de 22 cisticercos. O fato de se ter encontrado um limiar de positividade com dois cisticercos, no presente experimento, deve-se provavelmente, pela análise ter sido realizada em bovinos infectados experimentalmente, os quais receberam 20.000 ovos, em desafio único. A intensidade da resposta imune pode ser diferente em infecções naturais, quando o animal recebe pequeno número de ovos, por um longo período.

No bovino N° 3 foram detectados anticorpos precocemente. Doze dias após a infecção, com ovos de *Taenia saginata*, já era assinalado uma reatividade de média intensidade que se manteve por período curto. A justificativa provável é que este animal tenha anteriormente entrado em contato com antígenos que reagem de forma cruzada, tendo sido a resposta a dose desafio bastante rápida. Esta resposta precoce, entretanto, está em conformidade com resultados obtidos por KYVSGAARD et al., (1991) em bezerro intensamente infectado, no qual foi detectado anticorpos, à partir de uma semana pós infecção. Neste experimento, o animal N° 1 apresentou pico de anticorpos inicial, de maior intensidade, aos 27 dias pós infecção. Aos 36 dias este animal apresentou reatividade bem acima do “cut-off”. O ápice de reação, em todos os animais infectados, foi entre 41 e 55 dias após infecção. Resultados semelhantes foram obtidos por GALLIE e SEWEEL, (1981);

KAMANGA-SOLO et al., (1987); HAYUNG et al., (1991); KYVSGAARD et al., (1991), os quais relatam detecção de anticorpos a partir de três a quatro semanas pós infecção. Por sua vez, BRANDT et al., (1992) detectou anticorpos, um pouco mais tarde, à partir da sexta semana pós infecção. As razões do aparecimento dos anticorpos, somente a partir de um determinado período após infecção são discutíveis. Este período poderia ser o tempo necessário para que os antígenos usados no imunodiagnóstico sejam percebidos pelo sistema imune do hospedeiro. Ou ainda pode refletir o tempo normal requerido para os bovinos elevar a resposta de anticorpos a níveis detectáveis pela prova de ELISA.

No teste com soros bovinos considerados livres de cisticercos pela inspeção normal, verificou-se que dos 20 animais amostrados 02 apresentaram reatividade acima do "cut-off" (0,310 de absorbância). Estes dois animais eram prováveis portadores de cisticercos.

O teste de ELISA forneceu dados relevantes sobre o comportamento imunológico de bovinos portadores de cisticercose. Em função dos animais infectados desenvolverem anticorpos, mas, no curso da infecção, os níveis dos mesmos poderem cair abaixo do "cut-off", demonstra que o teste não é totalmente adequado para o diagnóstico individual. Porém, além de fornecer dados sobre o comportamento imunológico dos bovinos frente a cisticercose, os resultados obtidos, no presente trabalho, demonstram a possível aplicação do teste de ELISA na epidemiologia da parasitose. Animais que vão para o abate, com sorologia positiva, poderiam sofrer inspeção diferenciada. Teste sorológico de bovinos nascidos e criados na mesma propriedade, e com sorologia positiva sugerem a presença de indivíduos portadores de teníase, entre aqueles que têm contato com

os animais da propriedade. Assim, através da sorologia para cisticercose bovina, pode-se monitorar a prevalência da teníase humana. Repetidos exames do rebanho podem indicar o período de introdução da patologia na propriedade. Na compra de animais para engorda e posterior abate, a sorologia poderia ser um alerta de possíveis perdas futuras.

Com relação ao teste de ELISA, empregando o antígeno homólogo, extrato salino total de *Cysticercus bovis*, frente os soros dos bovinos experimentalmente infectados, verificou-se o surgimento de anticorpos à partir de 34 dias após a infecção. Os anticorpos apresentaram níveis crescentes atingindo ápice entre 41 e 55 dias. A seguir mostrou um lento declínio, até a estabilização ou o recrudescimento a partir de 75 dias. No geral, verificou-se alta correlação dos resultados do teste com antígeno extrato salino total de *Cysticercus bovis*, em comparação do teste empregando o antígeno extrato salino parcial de *Cysticercus cellulosae*. Observou-se, entretanto, valores de absorbância sensivelmente menores ao empregar o antígeno homólogo.

Com a utilização de extrato salino parcial de *Cysticercus cellulosae*, e extrato salino total de *Cysticercus bovis* como antígeno, não se pode afirmar se os anticorpos encontrados são contra oncosferas degeneradas ou contra a população de cisticercos (que conseguiram se estabelecer e mais tarde morreram) ou ainda contra as secreções dos cisticercos sobreviventes. Conclusão semelhante foi observada por HAYUNGA et al., (1991). BRANDT et al., (1992), observaram reatividade entre anticorpos monoclonais anti produtos de secreção-excreção de *Cysticercus bovis*, no soro de bovinos, portadores de cisticercose, provenientes de infecção experimental.

Foi também testado o antígeno total de *Cysticercus longicollis*, com os soros dos bovinos experimentalmente infectados. Na concentração de antígeno de 250 ng por “weel” verificou-se reatividade bastante baixa, com extremos de 0,006 a 0,085. Aumentando-se a concentração para 1,0 µg por “weel” houve aumento dos valores de absorbância, porém ainda baixos. Fez-se então teste com 3,0 µg por “weel”, obtendo-se valores de absorbância maiores em relação as concentrações anteriores. Detectou-se anticorpos a partir de 34 dias da infecção, seguindo-se por valores crescentes atingindo ápice entre 48 e 62 dias. A seguir veio lento declínio, e finalmente, a partir de 75 dias da infecção, observou-se início de um segundo pico de anticorpos.

Ao analisar a reatividade dos testes com os três antígenos observa-se acentuada correlação, sendo nítida a presença de dois picos de anticorpos praticamente coincidentes, no espaço de tempo. Os valores de absorbância obtidos no teste com os três antígenos são em ordem decrescente de *Cysticercus cellulosae*, *Cysticercus bovis*, *Cysticercus longicollis*. Verifica-se que os valores de absorbância são mais próximos empregando os antígenos de extrato salino parcial de *Cysticercus cellulosae* e extrato salino total de *Cysticercus bovis*, que são larvas morfológicamente semelhantes. Porém, os valores de absorbância estão distantes em relação ao *Cysticercus longicollis*, que possui morfologia acentuadamente distinta. Os valores de densidade ótica mais elevados, com antígeno da larva da *T. solium*, reflete maior reatividade das estruturas constituintes do escólex, colo e pseudo-estróbilo, em relação a larva total da *T. saginata*.

Novos trabalhos devem ser realizados com o objetivo de aprimorar a técnica ELISA, buscando torná-la mais rápida, sensível e específica.

5. - CONCLUSÕES

1. Na infecção experimental os cisticercos da *Taenia saginata* encontraram-se distribuídos por toda a musculatura dos bovinos, não mostrando predileção pelos tecidos normalmente pesquisados pelo serviço de inspeção: língua, coração, diafragma, músculos mastigatórios.
2. Os bovinos adultos são mais resistentes a infecção por ovos de *Taenia saginata*, apresentando menor número de cisticercos e com maior número de cistos calcificados.
3. Os antígenos, extrato salino parcial de *Cysticercus cellulosae* e extrato salino total de *Cysticercus bovis*, apresentaram boa reatividade com soro de bovinos experimentalmente infectados com ovos da *T. saginata*. Seu emprego é recomendável na prova de ELISA para imunodiagnóstico da cisticercose bovina.
4. O antígeno total de *Cysticercus longicollis* apresentou reatividade 2,6 e 6 vezes inferior em comparação com os antígenos da *T. saginata* e *T. solium*. Novos estudos são necessários para avaliar as possibilidades de sua utilização em teste imunodiagnóstico da cisticercose bovina.
5. O teste de ELISA foi realizado com concentração ótima de antígeno, extrato salino parcial de *C. cellulosae*, igual a 250 ng/pocinho, conjugado diluído 1:400 e amostras de soros diluídas 1:100.
6. O comportamento imunológico dos bovinos, em termos de anticorpos específicos, anti-*Cysticercus bovis*, mostrou desenvolvimento em níveis crescentes, atingindo ápice entre 41 e 55 dias, seguindo-se um lento declínio com início de um segundo pico a partir de 75 dias.

7. A resposta imunológica dos bovinos reflete três momentos da patologia:

- primeiramente, com a ingestão dos ovos e formação dos cisticercos ocorre amplo contato entre o sistema imune e antígenos constituintes ou produtos do metabolismo dos cisticercos, levando ao desenvolvimento do primeiro pico de anticorpos.
- em segundo lugar, com o desenvolvimento dos cisticercos forma-se, por parte do hospedeiro, uma membrana circundando a larva, criando uma barreira física que limita o contato com o sistema imune. Diminuindo a estimulação, tem-se como consequência queda no nível de anticorpos.
- enfim, rompendo-se o equilíbrio existente entre parasita e hospedeiro ocorre a degeneração dos cisticercos, há liberação de antígenos causando nova estimulação do sistema imune, levando ao segundo pico de anticorpos.

8. Os bovinos portadores de maior número de cisticercos apresentaram valores de absorbância mais elevados, mas esta relação não foi constante.

9. A prova de ELISA em bovinos inspecionados e considerados negativos pelo serviço de inspeção revelou animais soro positivos, indicando serem estes prováveis portadores de cisticercos.

10. Provas imunoenzimáticas como ELISA, para a identificação de anticorpos ou antígenos constituintes do cisticerco, poderiam ser utilizadas em: inquéritos epidemiológicos, com finalidade de estimar a incidência da cisticercose bovina e indiretamente da teníase humana; determinar o período provável da introdução da doença na propriedade, predição de perdas futuras na compra de animais para engorda. Todavia, devido as alterações dos níveis de anticorpos nos bovinos portadores de cisticercos, no transcorrer da afecção, especialmente os

que possuem infecção leve, a prova de ELISA pode apresentar resultados negativos falsos. Esta prova não se mostra portanto, totalmente adequada para o diagnóstico individual.

11. Novos estudos devem ser realizados, especialmente no que se refere a tornar a prova de ELISA mais sensível, capaz de detectar baixos níveis de anticorpos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDIEV, T. A. Zoonosis control collection of teaching aids for international training course. **Centre of International Projecte GKNT**, Moscow, v. 2, p. 196-201, 1968.
2. ABDULLAEV, A. M. Survival of *Cysticercus bovis* in veal dishes prepared in the Buryat Assr. **Meditinskaja Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni**, Moscow, v. 37, p. 108-109, 1918.
3. ABDUSSALAN, A. M. El problema de la teniasis y la cisticercosis. In: **Organizacion Panamericana de la Salud. Reunión interamericana sobre el control de la fiebre aftosa y otras zoonosis**. Puerto Espanã, 1974. Washington, 1975, p. 117-129 (Publicación científica 295).
4. ADONAJÓ, A.; KOZAKIEWICZ, B.; PAWLOWSKI, Z. S. et al. Transmission of *Taenia saginata* in rural areas. **Przegląd Epidemiologiczny**, Warsaw, v. 29, p. 327-334, 1975.
5. ANATARAMAN, M. The prevalence and transmission of human taeniasis in Índia. In: **INTERNATIONAL CONGRESS OF VETERINARY (3. : 1974 : Munich). Proceedings of the Trird International Congress of Parasitology**. Munich, 1974. v. 1, p. 394-395.
6. ARAMBULO, P. V.; CABRERA, B. D.; TONGSON, M. S. Studies on the zoonotic cycle of *Taenia saginata* taeniasis and cysticercosis in the Philippines. **International Journal of Zoonoses**, Taipei, v. 3, p. 77-104, 1978.
7. BERRY, L.R.; BORROWS, R. B. Appendicitis with cestoses. Reporte de case. **Archives of Pathology**, Chicago, v. 59, p. 587-593, 1955.
8. BLAHA, G.; PARIS, N. Examen en microscopie électronique de l'aspect externe des cabosses du cacaoyer infectées por *Phytophthora megakarya*. **Café Cacao et Thé**, Paris, v. 31, p. 23-34, 1987.
9. BORCHERT, A. Cestoidea. In: _____ **Parasitologia Veterinária**. 3. ed. Zaragoza, España : Acibria, 1981. p. 162-200.
10. BRANDT, J.R.A.; GEERTS, S.; DEKEN, R. D. et al. A monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating excretory-secretory antigens in *Taenia saginata* cysticercosis. **International Journal for Parasitology**, Kidlington, v. 22, n. 4, p. 471-477, 1992.

11. BRICENO, C. E.; BIAGI, F.; MARTINEZ, B. Cysticercosis: observaciones sobre 97 casos de autopsia. **La Prensa Médica Mexicana**, Mexico, v. 26, p. 193-197, 1961.
12. CAÑEDO, L.; LACLETTE, J.P.; MORALES, E. Evagination of the metacestode of *Taenia solium*. In: FLISSER, A.; WILLMS, k.; LACLETTE, J. P. et al. **Cysticercosis presente state of kowledge and perspectives**. New York : Academic press, 1982. p. 363-373.
13. CARMICHAEL, J. Animal-man relationship in tropical disases in Africa. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 46, p. 385-394, 1952.
14. CHULARERK, P.; RASAMEEPRABHA, K. ; PAPASARATHORN, T. et al. Some aspects of epidemiology and mass treatment of taeniasis in Ban Tard, Udorn Thani. **Journal of the Medical Association of Thailand**, Bangkok, v. 50, p. 666-670, 1967.
15. COSTA,J.M. Teste imunoenzimático (ELISA) no diagnóstico da neurocisticercose. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v. 44, n.1, p. 15-31, 1986.
16. CRAIG, P. S.; RICKARD, M. D. Evaluation of "crude"antigen prepared from *Taenia saginata* for the sorological diagnosis of *T. saginata* cysticercosis in catt using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Zeitschrift fuer Parasitenkunde**, Berlin, v. 61, p. 287-297,1980.
17. DUTHY, B. L.; VAN SOMEREN, V. D. The survival or *Taenia saginata* eggs on open pastuere. **East African Agricultural and Forestry Journal**, Nairobi, v. 13, p. 147-148, 1948.
18. ENCONTRO DO CONE SUL E SEMINÁRIO LATINO AMERICANO SOBRE TENÍASE E CISTICERCOSE (1:1994 : Curitiba). **Anais**. Curitiba : Secretaria de Saúde do Estado do Paraná, 1994. p. 38-44.
19. FAN, P. C. Taiwan *Taenia* and taeniasis. **Parasitology Today**, Cambridge, v. 4, p. 86-88, 1988.
20. ENGVAL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-Linked immunosorbent Assay (ELISA). Quantitative Assay ofimmunoglobulin G. **Immunochemistry**, v. 8, p. 871, 1971.
21. FAN, P. C.; LIN, C.Y.; WU, W. U. Experimental studies of Korea *Taenia* (Cheju strain) infection in domestic animals. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, London, v. 83, n. 4, p. 395-403, 1989.
22. FAN, P. C.; SOH, C. T.; KOSIN, E. Pig as a favorable intermediate host of a possible new species of *Taenia* in Asia. **Yonsei Reports on Tropical Medicine**, Seoul, v. 21, p. 39-58, 1990.

23. FAN, P. C.; CHUNG, W. C.; LIN, C. Y. et al. Experimental infection with *Taenia saginata* (Poland strain) in Taiwanese pigs. **Journal of Helminthology**, Wallingford, v. 66, p. 198-204, 1992.
24. FAY, L. D. Exposure of Thomson's gazelle to experimental infection with *Cysticercus bovis*. **Veterinary Record**, London, v. 90, p. 34-35, 1972.
25. FONTAN, C. *Cysticercus bovis* chez l'homme localisé dans la région mammaire. **Gazette des hôpitaux civils et militaires**, Paris, v. 92, p. 183-184, 1919.
26. FREEMANN, R. S. Studies on the biology of *Taenia crassiceps*. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 40, p. 969-990, 1962.
27. GALLIE, G. J.; SEWELL, M. M. H. Inoculation of calves and adult cattle with oncospheres of *Taenia saginata* and their resistance to challenge infection. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 13, p. 147-154, 1981.
28. GEERTS, S.; KUMAR, V.; CEULEMANS, F.; MORTELMANS, J. Serodiagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis in experimentally and naturally infected cattle by enzyme linked immunosorbent assay. **Research in Veterinary Science**, London, v. 30, p. 288-293, 1981.
29. GEMMELL, M.; MATYAS, Z.; PAWLOWSKI, Z.; SOULSBY, E. J. L. **Guidelines for surveillance prevention and control of taeniasis cysticercosis**. Genève: World Health Organization (WHO), 1983. p. 23-58.
30. GEMMEL, M. A.; LAWSON, J. R. Ovine cysticercosis: An epidemiological model for the cysticercosis. I. The free-living egg phase. In: FLISSER, A.; WILLMS, K.; LACLETTE, J.P. et al. **Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives**. New York: Academy Press, 1982. p. 87-89.
31. HARRISON, L. J. S.; SEWELL, M. M. H. Antibody levels in cattle naturally infected with *Taenia saginata* metacestodes in Britain. **Research Veterinary Science**, London, v. 31, p. 62-64, 1981.
32. HARRISON, L.J.S.; JOSHUA, G. W. P.; WRIGHTE, S. H. et al. Specific detection of circulating surface/secreted glycoproteins of viable cysticerci in *Taenia saginata* cysticercosis. **Parasite immunology**, Oxford, v. 11, p. 351-370, 1989.
33. HAYUNGA, E. G.; SUMMER, M. P.; RHOADS, M. L. et al. Development of a serologic assay for cysticercosis, using an antigen isolated from *Taenia spp* cyst fluid. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 52, n. 3, p. 462-470, 1991_a.

34. HAYUNGA, E. G.; WONG, M.M.; SUMNER, M. P. et al. Evaluation of a 'dipstick' immunoassay to detect cysticercosis in experimentally infected cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 38, p. 13-22, 1991_b.
35. HOFFMANN, R. D. **Diagnóstico de parasitismo veterinário**. Porto Alegre : Sulina, 1987. p. 39-143.
36. HUANG, S. W. Studies on *Taenia* species prevalent among the aborigines in Wulai District, Taiwan. **Bulletin of the Institute of Zoology Academia Sinica**, Taipei, v. 6, p. 29-34, 1967.
37. JEPSEN, A.; ROTH, J. Epizootiology of *Cysticercus bovis* - resistance of the eggs of *Taenia saginata*. In: INTERNATIONAL VETERINARY CONGRESS (14. : 1952 : London). **Proceedings of the 14th International Veterinary Congress**. London, 1952. p. 43-50.
38. JUNG, R. C.; RODEIGUES, M. A.; BEAVER, P. C. et al. Racemose *Cysticercus* on human brains. A case report. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 30, p. 620-624, 1981.
39. KAMANGA-SOLLO, E. I. P.; RHOADS, M. L.; MURRELL, K. D. Evaluation of an antigenic fraction of *Taenia hidatigena* metacestode cyst fluid for immunodiagnosis. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.48, p. 1206-1210, 1987.
40. KYVSGAARD, N. C.; ILSOE, B.; HENRIKSEN, S. Aa.; NANSEN, P. Distribution of *Taenia saginata* cysts in carcasses of experimentally infected calves and its significance for routine meat inspection. **Research Veterinary Science**, London, v. 49, p. 29-30, 1989.
41. KYVSGAARD, N. C.; ILSOE, B.; HENRIKSEN, S. A.; FELD, N.C. et al. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of *Taenia saginata* cysticercosis in cattle. **Acta Veterinaria Scandinavia**, Vanlose, v. 32, p. 233-241, 1991.
42. LAPAGE, G. Classe Cestoda. In: _____ **Parasitologia Veterinária**. 6. ed. México : Compañia Editorial Continental, 1981. p. 295-305.
43. LONARDONI, M. V.; BERTOLINI, D. A.; SILVEIRA, T. G. V. et al. Frequência de anticorpos anti-*Cysticercus cellulosae* em indivíduos de cinco municípios da região Norte do Estado do Paraná - Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 273-279, 1996.

44. LOWRY, H. L.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A. L. Protein measurement with the Folim phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, Bethesda, p. 265-275, 1951.
45. MAHAJAN, R. C. Geographical distribution of human cysticercosis. In: FLISSER, A.; WILLMS, K.; LACLETTE, J. P. et al. **Cysticercosis: presente state of knowledge and perspectives**. New York : Academic Press, 1982. p. 39-46.
46. MAKARUK, Z.; LESZEWSKA-POTOCKA, J.; SPORNY, S. Surgical complications of taeniasis of the bile track (case reports). **Polski Tygodnik Lekarski**, Warsaw, v. 34, p. 1633-1634, 1979.
47. MESSNER, K. H.; KAMMERER, W. S. Intraocular cysticercosis. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, v.97, p. 1103-1105, 1979.
48. MURRELL, K.D.; FAYER, R.; DUBEY, J. P. Parasitic organisms. **Advances in meat Research**, New York, v. 2, p. 311-376, 1986.
49. NADZHAFOV, I. G. The role of different species of synanthropic flies in dissemination of oncospheres of *Taeniarhynchus saginatus*. **Meditinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni**, Moscow, v. 36, p. 144-149, 1967.
50. NADZHAFOV, I. G.; CHOBANOV, R. E. Survival times and rates of *Taenia saginata* oncospheres in soil in the Kubinsk district (USSR). **Meditinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni**, Moscow, v. 42, p. 358-360, 1973.
51. NAGATY, H. F. Is measles beef cured as "basterma" fit for human consumption. **Journal of the Royal Egyptian Medical Association**, Cairo, v. 36, p. 144-149, 1967.
52. NINO, F. L. Cysticercosis humano en la Republica Argentina. Estudio de una nueva observacion. **Prensa Médica Argentina**, Buenos Aires, v.37, p. 3040-3044, 1950.
53. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD/ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. **Epidemiologia y control de la teniasis/cisticercosis en la América Latina**. Version 3.0, PNSP/91-28, 1994.
54. PARKHOUSE, R. M. E. ; HARRISON, L. J.S. Antigens of parasite helminthes and diagnosis, protection and pathology. **Parasitology**, v. 99(suppl.), p. S5-S19, 1989.
55. PAWLOWSKI, Z. S. Studies on epidemiology of *Taenia saginata*: taeniasis and cysticercosis. **Wiadomosci Parazytologiczne**, Warsaw, v. 26, p. 539-552, 1980.
56. PAWLOWSKI, Z. S. Cestodiasis. In: BRAUDE, A. I. **Medical Microbiology and Infections Diseases**. Philadelphia : Saunders, 1981. v. 2. p. 1087-1093.

57. PAWLOWSKI, Z. S.; SCHULTZ, M. G. Taeniasis and cysticercosis (*Taenia saginata*). **Advances in Parasitology**, London, v. 10, p. 269-343, 1972.
58. PAWLOWSKI, Z. S. Cestodiasis. In: WARREN, K. S.; MAHMOUD, A. A. F. **Tropical and geographical medicine**. New York : Mc Graw-Hill Book, 1984. p. 471-486.
59. PESSOA, S. B.; MARTINS, A. V. **Parasitologia médica**. 11. ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1988. p. 813-850.
60. PROCTOR, E. M. Identification of tapeworms. **South African Medical journal**, Pinelands, v. 45, p.234-238, 1972.
61. RABIELA-CERVANTES, M. T.; RIVAS-HERNANDES, A.; RODRIGUEZ-IBARRA et al. Anatomopathological aspects of human brain cysticercosis. In: FLISSER, A.; WILLS, K; LACLETTE, J. P. et al. **Cysticercosis presente state of knowledge e perspectives**. New York: Academic Press, 1982. p. 179-200.
62. REY, L. Tênia e teníases. In: _____ **Parasitologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 425-446.
63. RIVAS, D. *Cysticercosis bovis in man*. In : **Commemoration of the 30th anniversary of K. I. Skryabin**. Moscow : Izdatelstvo Akademii Nauk SSR, 1937. p. 569-570.
64. ROTHMAN, A. H. Studies on the excystment of tapeworms. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 8, p. 368, 1959.
65. ROUND, M. C. Observations on the possible role of filth flies in the epizootiology of bovine cysticercosis in Kenya. **Journal of Hygiene**, Cambridge, v. 59, p. 505-513, 1961.
66. RUKHOVA, A. M. The survival rate of oncospheres of the beef tapeworm in the Moldavian SSR. In: SKRYABIN, K. I. **Helminths of man, animal and plants and their control: papers on helminthology**. Moscow : Izdatelstvo Akademii Nauk SSR, 1963. p. 340-342.
67. SAFRONOV, M. G. O gelmintofaunie oleney w Tompnskom i Olenjelskom rajonach Jakutskoj. ASSR. **Trudy Jakutskogo Nauchnoisledovatel'skogo Instituta Sel'skogo Chozjaistva**, Moscow, v. 3, 1960.
68. SANTOS, I. F. Diagnóstico da cisticercose bovina em matadouros. **Higiene Alimentar**, v. 7, n. 25, p. 26-34, 1993.
69. SHARIN, H. Migrating tapeworms in the trachea. **Journal of the Egyptian Medical Association**, Cairo, v. 15, p. 299, 1932.

70. SILVERMAN, P. H.; GRIFFITHS, R. B. A review of methods of sewage disposal in Great Britain, with special reference to the epizootiology of *Cysticercus bovis*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, London, v. 49, p. 436-450, 1955
71. SILVERMAN, P. H. Studies on the biology of some tapeworms of the genus *Taenia*. II. The morphology and development of the taeniid hexacanth embryo and its enclosing membranes, with some notes on the development and propagation of gravid segments. **Annals of tropical Medicine and Parasitology**, London, v. 48, p. 356-366, 1954.
72. SMITH, H. J.; SNOWDON, K. E.; GREGORY, D. et al. Assessment of an enzyme-linked immunosorbent assay using a *Taenia hydatigena* fraction antigen in the diagnosis of cysticercosis in cattle. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 54, p. 299-300, 1990.
73. SMITH, H. J.; SNOWDON, K. E.; FINLAY, R. C. Serological diagnosis of cysticercosis by an enzyme-linked immunosorbent assay in experimentally infected cattle. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 55, n. 3, p. 274-276, 1991.
74. SOULSBY, E. J. L. Zjawiska immunologiczne w przebiegu inwazji robaków pasożytniczych. **Polska Akademia Nauk**, Warsaw, p. 60, 1961.
75. SOULSBY, E. J. L. Immunological unresponsiveness to helminth infections in animals. In: INTERNATIONAL VETERINARY CONGRESS (17. : 1963 : Hannover). **Proceedings of the 17th. International Veterinary Congress**. Hannover, 1963, v. 1, p. 761-767.
76. STEVENSON, P.; MUCHEMA, C.; KARSTAD, L. *Taenia saginata* infection in east African antelopes. **Veterinary Record**, London, v. 111, p. 322, 1982.
77. TRELLES, J. O.; TRELLES, L. Cisticercosis of the nervous system. In: VINKEN, P. J. et al. **Infections of the nervous system, part. III**. Amsterdam, North Holland, 1978. p. 291-320.
78. VAZ, A. J.; HANASHIRO, A. S. G.; CHIEFFI, P. P.; FERREIRA, A. W. et al. Frequência de indivíduos com anticorpos séricos anti-*Cysticercus cellulosae* em cinco municípios do Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 2, p. 97-99, 1990.
79. VAZ, A. J. *Cysticercus longicollis* caracterização antigênica e desenvolvimento de testes imunológicos para pesquisa de anticorpos em líquido cefalorraquiano no imunodiagnóstico da neurocisticercose humana. São Paulo, 1993. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Referências Bibliográficas

80. VIANA, L.G.; COSTA-CRUZ, J. M.; MACEDO, V. et al. Estudo comparativo dos testes imunoenzimáticos ELISA-G e ELISA-M, imunofluorescência indireta e fixação do complemento no diagnóstico da cisticercose humana. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v. 50, n. 3, p. 302-308, 1992.
81. WALTER, M.; KOSKE, J. K. *Taenia saginata* cisticercosis: a comparison of routine meat inspection and carcass dissection results. **Veterinary Record**, London, V. 106, p. 401-402, 1980.
82. WORLD VETERINARY CONGRESS (17 : 1963 : Hannover). Immunological unresponsiveness to helminth infections in animals. **Annals**. Hannover, 1963. v.1, p. 761-767.
83. YINGKUN, F.; SHAN, O.; XIUZZHEN, Z. et al. Clinicoe lectrocephalographic studies of cerebral cysticercosis, 158 cases. **Chinese Medical Journal**, Beijing, v. 92, p. 770-786, 1979.
84. ZENTANO-ALANIS, G. H. A classification of human cysticercosis. In: FLISSER, A.; WILLMNS, K.; LACLETTE, J. P. et al. **Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives**. New York: Academic Press, 1982. p. 107-126.

7. - ANEXOS

7.1. - ANEXO 1

7.1.1. - LISTA DE EQUIPAMENTOS E MATERIAIS

- ♦ Agulha descartável, 12x20;
- ♦ Balão de fundo chato, capacidade 500 ml;
- ♦ Banho maria modelo 100;
- ♦ Bastão de vidro;
- ♦ Becker de 100 ml;
- ♦ Becker de 250 ml;
- ♦ Bisturi descartável N° 10 e 11;
- ♦ Câmara de Neubauer;
- ♦ Centrífuga Bekman J-21B;
- ♦ Centrifugador EXCELSA 2;
- ♦ Dessecador;
- ♦ Erlemayer de 250 ml;
- ♦ Estante para tubos em aço;
- ♦ Estufa com temperatura ajustável;
- ♦ Frasco de vidro neutro capacidade de 7 ml;
- ♦ Freezer INDREL CPH 35;
- ♦ Gral;
- ♦ Homogeneizador Van Potter Elvehjen;
- ♦ Lacre de alumínio;

- ♦ Lacrador de frascos manual;
- ♦ Lâminas de vidro para microscopia;
- ♦ Leitor de placas Multiskan MCC/340P, versão 2.20;
- ♦ Liofilizador LIOMAX I;
- ♦ Luva cirúrgica Nº 7.0, 7.5, 8.0, 8.5;
- ♦ Luva plástica descartável;
- ♦ Multipipetador;
- ♦ Pinça anatômica em aço inox, 16 cm;
- ♦ Pinça dente de rato em aço inox, 16 cm;
- ♦ Pipeta automática capacidade: 20µl, 20-200µl, 200-1000µl;
- ♦ Pipeta automática, com 12 canais, capacidade 50-300µL;
- ♦ Pipeta graduada capacidade 1, 2, 3, 5, 10 ml;
- ♦ Pipeta volumétrica volumes: 1, 2, 3, 5, 10 , 20 ml;
- ♦ Pistilo;
- ♦ placa hemobag de 96 "weels";
- ♦ Placa de Petri;
- ♦ Ponteiras descartáveis para micropipetas;
- ♦ Proveta em vidro graduada capacidade 10, 500, 2000 ml;
- ♦ Saco de lixo hospitalar, volume 100 litros;
- ♦ Seringa plástica descartável capacidade 25 ml;
- ♦ Tampa de borracha;
- ♦ Tesoura ponta reta, inox 16 cm;
- ♦ Tubo de centrífuga em polipropileno capacidade de 15 ml;
- ♦ Tubo de centrífuga em polipropileno capacidade de 50 ml;
- ♦ Tubo de ensaio 2 x 20 cm;

7.1.2. - LISTA DE REATIVOS

- ♦ Ácido cítrico ($C_6H_8O_7$);
- ♦ Ácido sulfúrico (H_2SO_4)
- ♦ Caseína;
- ♦ Carbonato de sódio (Na_2CO_3);
- ♦ Bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$);
- ♦ Fosfato de sódio Dibásico (Na_2HPO_4);
- ♦ Cloreto de sódio ($NaCl$);
- ♦ Hidróxido de sódio ($NaOH$);
- ♦ Orto-fenileno-diamino (OPD);
- ♦ Peróxido de hidrogênio (H_2O_2);
- ♦ Reativo de Folin-Ciocalteu;
- ♦ Sulfato de cobre ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)
- ♦ Tartarato de sódio e Potássio ($KNaC_4O_6 \cdot 4H_2O$)
- ♦ Tween 20;

7.2. - ANEXO 2

7.2.1. - COATING BUFFER (tampão carbonato 0,05 M)

- ◇ Solução A: 1,1 g de $NaCO_3$ para 0,2 litros ou 200 ml de H_2O deionizada.
- ◇ Solução B: 4,2 g de $NaHCO_3$ para 1 litro de deionizada.
- ◇ Acertar o pH para 9,6 adicionando solução A em B.

7.2.2. - SOLUÇÃO DE LAVAGEM

- 9 g de NaCl;
 - 0,5 g de Tween 20;
 - H₂O (d) q.s.p. 01 litro.
- Observação: adicionar Tween 20 após dissolver o NaCl.

7.2.3. - SOLUÇÃO DE BLOQUEIO DA PLACA

- Caseína 2 % em PBS, aquecer para facilitar a dissolução;
- 0,05 % de Tween 20 com o objetivo de diminuir reações inespecíficas.

Constituição do PBS 0,05 M com 0,15 M de NaCl, pH 7,4

Solução A:

- 7,1 g Na₂HPO₄ ou 10,82 g de Na₂HPO₄.12 H₂O;
- 8,8 g NaCl;
- H₂O (d) q.s.p. 1 litro.

Solução B:

- 1,4 g NaH₂PO₄;
- 1,88 g NaCl;
- H₂O (d) q.s.p. 0,2 litros.
- Acertar o pH para 7,4 adicionando a solução B em A.

7.2.4. - TAMPÃO DE INCUBAÇÃO

Preparação A

- 0,25 % de caseína;
- 0,05 % de Tween 20;
- Diluição em PBS;
- 25 ml de caseína a 2 % em 200 ml de tampão

Preparação B

- Tampão de Incubação a partir da solução de bloqueio:
- 62,5 ml solução de bloqueio;
- 0,25 ml Tween 20;
- PBS q.s.p. 500 ml.
- Alicotar em volumes de 10 ml e congelar.

7.2.5. - TAMPÃO CITRATO - pH 5,0

- 7,10 g Na_2HPO_4 ou 13,4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;
- 5,19 g de ácido cítrico;
- H_2O (d) q.s.p. 01 litro.

7.2.6. - SOLUÇÃO SUBSTRATO - OPD 2 mg

- Orto-fenileno-diamino (OPD) - 2 mg;
- H_2O_2 - 2 μl ;
- Tampão citrato, pH 5,0 - 10 ml.

•Observação: A solução substrato foi preparada no momento da utilização. Para isso pipetou-se o tampão citrato, a seguir adicionou-se OPD e H_2O_2 . O recipiente foi deixado ao abrigo da luz enquanto o OPD era dissolvido, a seguir procedeu-se a distribuição na placa.

7.2.7. - SOLUÇÃO DE BLOQUEIO DA REAÇÃO

- H_2SO_4 - 1 ml;
- H_2O (d) - 19 ml.
- Observação: Adicionar 20 μl /weel.

7.3. - ANEXO 3

CÁLCULO PARA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DA AMOSTRA:

Na figura 08 -----40 μg de proteínas

40 μg ----- 100 μl

400 μg -----1000 μl = 0,4 mg/ml ou 400 μg /ml.

Padrão utilizado: BSA Sigma concentração 1,05mg/ml.

Aparelho: Espectofotometro Siel 500.

Reagentes: conforme técnica conhecida.

Reagente A:

- 1,0 ml de CuSO_4 a 2,0%;
- 1,0 ml tartarato de Na e K, diluído para 50 ml de Na_2CO_3

- 3,0%; diluído em NaOH 0,2M .

Reagente B:

- 1,0 ml de reagente de Folin;
- 2,0 ml de água destilada.

7.4. - ANEXO 4

CÁLCULO DO VOLUME DE ANTÍGENO A SER UTILIZADO POR WEEL

**CÁLCULO DO VOLUME DE ANTÍGENO DE *CYSTICERCUS*
CELLULOSAE POR PLACA**

1 "weel"----- 250 ng

100 "weel" -----X ng

X= 25.000 ng ou 25 µg

1.000 µl solução de antígeno-----400 µg

X =25 µg

X= 62,5 µl.

Para sensibilização dilui-se 62,5 µl da solução de antígeno (400 ng de proteínas por ml) em 9.937,5 µl da solução de COATING BUFFER. Homogeneizou-se a solução com o multipipetador. Na placa foi distribuído

100 µl/wheel da solução, com exceção da coluna No.1 (branco). A placa com o antígeno foi incubada “over night” em geladeira.

CÁLCULO DO VOLUME DE ANTÍGENO *CYSTICERCUS BOVIS* POR PLACA

01 “wheel”-----250 ng

100 “wheel”-----X ng

$$X = 25.000 \text{ ng ou } 25 \text{ } \mu\text{g}.$$

Feita a dosagem de proteína pelo método de LOWRY, (1951), verificou-se concentração protéica de 0,39 mg por ml.

1.000 µl da solução de antígeno-----390 µg

$$X = .25 \text{ } \mu\text{g}$$

$$X = 64,10 \text{ } \mu\text{l}.$$

Inicialmente descongelou-se o antígeno produzido, agitou-se (com agitador tipo vortex) retirou-se 64,10 µl, os quais foram dissolvidos em 10 ml de COATING BUFFER. Os procedimentos seguintes foram idênticos aos da sensibilização com antígeno de *Cysticercus cellulosae*.

CÁLCULO DO VOLUME DE ANTÍGENO DE *CYSTICERCUS LONGICOLLIS* POR PLACA

01 “wheel”-----3,0 µg

100 "weel"-----X

$$X = 300 \mu\text{g}$$

Concentração protéica do antígeno de 4,8 mg por ml.

01 ml de antígeno-----4.800 μg

$$X = \text{-----} 300 \mu\text{g}$$

$$X = 0,0625 \text{ ml ou } 62,5 \mu\text{l.}$$

Os procedimentos para sensibilização da placa com antígeno total de *Cysticercus longicollis* foram idênticos aos da sensibilização com antígeno extrato salino parcial de *Cysticercus cellulosae* e extrato salino total de *Cysticercus bovis*.